



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés



Faculté des sciences et de la technologie Université
Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Thèse présentée pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES
SPECIALITE : GÉNIE DES PROCÉDÉS

PAR

M^{elle} Bendahmane Leila

Etude des ions libérés (calcium, oxalate, phosphate) par des
calculs urinaires en présence des substances naturelles

Date de soutenance : 19/03/2019 à 13:00

Devant la commission de jury composée de :

Président :	Driouch Aouatef	Maitre de conférences A	Université de Mostaganem
Examineurs :	Merine Houaria	Professeur	Université de Sidi Bel Abbes
	Ghali Noureddine	Maitre de conférences A	Université de Saïda
Rapporteur :	Kaid-Omar Zohra	Professeur	Université de Sidi Bel Abbes
Co-encadreur	Djelloul Abdelkader	Professeur	Université de Mostaganem

Dédicaces

Ce travail a pu être réalisé grâce à Dieu le tout puissant, qui m'a inspiré et guidé. Je remercie

Dieu de m'avoir donné cette chance

Je dédie ce travail à mon père Allah yarahmeh, en témoignage de ses sacrifices, de ses sollicitudes, ses encouragements et ses prières. Il a été et sera toujours un exemple pour moi par

ses qualités humaines et son perfectionnisme.

À ma mère, tu m'as comblé avec ta tendresse et ton affection tout au long de mon parcours.

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il le fallait. En ce jour mémorable,

pour moi ainsi que pour toi, reçois ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie

À mon frère et mes sœurs, autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Que Dieu le tout puissant vous

préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

À ma famille en générale

À mes amis

Remerciements

La réussite, aussi personnelle soit elle ne peut l'être tout à fait car elle ne pourrait avoir lieu sans un environnement propice. Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel et personnel à la réalisation de cette thèse.

Je remercie infiniment Madame **Kaid-Omar Zohra** Professeur à l'université de Sidi Bel Abbès qui après avoir été mon enseignante, puis mon encadreur en magistère, a bien voulu réitérer sa confiance, mais aussi pour ses conseils et sa patience à mon égard. Je la remercie pour m'avoir proposé ce sujet de thèse. Madame la professeur, trouvé dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération, notre reconnaissance et notre profond respect.

Je remercie Monsieur **Djelloul Abdelkader** Professeur de l'université de Mostaganem, mon enseignant pour sa patience, son dévouement et ses conseils.

Je voudrais remercier Madame **Driouch Aouatef**, Maitre de conférences A de l'université de Mostaganem d'avoir accepté de présider le jury et pour sa disponibilité, qu'elle trouve ici ma profonde reconnaissance.

Je remercie aussi Madame **Merine Houaria** Professeur à l'université de Sidi Bel Abbès qui m'a fait l'honneur d'évaluer ce travail. Je tiens à lui exprimé toutes mes reconnaissances.

Un grand merci à Monsieur **Ghali Noureddine** Maitre de conférences A de l'université de Saida d'avoir accepté de lire ce manuscrit et siégé en tant qu'examinateur parmi les jurés.

Je remercie sincèrement tous mes amis et collègues du laboratoire **Nadia, Linda, Amel, Soumia, Batoul, Nabila, Nacera, Samira, Meryem, Louisa, Islem, Mimi, Zohra**, ainsi qu'à mes collègues **M. Ghazzar, Mme Bouabdelli, M. Marwani** et **Mlle Damene**.

J'adresse mes remerciements à mes amis qui m'ont aidé, soutenu et accompagné jusqu'à l'aboutissement de ce travail. Je très reconnaissante à l'ensemble des membres du département de Génie des procédés de l'université de Mostaganem ainsi que tous mes enseignants.

Abréviations et symboles

A : Absorbance

AA : Acide Ascorbique

Ag : Agrégat

aq : aqueux

Ca : Calcium

CaCl₂, 2H₂O : Chlorure de Calcium dihydraté

CaOx : Oxalate de Calcium

cm : centimètre

COD : Oxalate de Calcium Dihydraté

COM : Oxalate de Calcium Monohydraté

CJ : Citron Jaune

CV : Citron Vert

Cr : Cristaux

D% : Taux de Dissolution

E : potentiel

g : gramme

I% : Taux d'Inhibition

IRTF : Infrarouge à Transformée de Fourier

J : Jaune

l : litre

M: Mole

MEB : Microscope à Balayage Electronique

mg: milligramme

ml: millilitre

min: minute

mM: millimole

mV : millivolt

NaCl : Chlorure de Sodium

Na₂C₂O₄ : Oxalate de Sodium

NS : *Nigella sativa*

O : Orange

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Ox : Oxydant

P : Pamplemousse

ppm : partie par million

Red : Réducteur

s : seconde

SI : Sans Inhibiteur

t : temps

T_{Max} : Taille maximale des cristaux.

T_{Moy} : Taille moyenne des cristaux.

V : Vert

VC : Vitamine C

v/v : volume/volume

Wed : Weddellite

Wew : Whewellite

µm : micromètre

Résumé

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'effet des substances naturelles sur la cristallisation oxalocalcique, dont la fréquence est élevée dans les calculs urinaires et les urines des sujets lithiasiques.

L'étude *in vitro* nous a montré que l'extrait de *Nigella sativa* en infusion, a exercé un pouvoir inhibiteur considérable sur la taille des cristaux d'oxalate de calcium. Le temps de germination a été décalé et un changement de phase d'oxalate de calcium monohydraté en oxalate de calcium dihydraté s'est produit.

L'inhibition des particules d'oxalate de calcium par les jus de fruits riches en vitamine C (orange, citron vert, citron jaune et pamplemousse), peut être la conséquence d'une modification de phase cristalline de whewellite en whedellite, par contre, la vitamine C commerciale et l'acide ascorbique pur n'ont pas donné les résultats attendus.

L'étude sur la détermination des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté de grande taille a donné un modèle qui répond à cette condition. Ce dernier a été choisi pour étudier l'effet des substances naturelles que sont le citron jaune, le vinaigre et *Nigella sativa* sur la taille de l'agrégat. Des taux de dissolution importants ont été observés avec le jus de citron qui a fissuré l'agrégat en cristaux.

Enfin, les résultats obtenus de la dissolution des calculs oxalocalciques par l'extrait de *Nigella sativa* sur la période expérimentale choisie, n'ont pas donné une différence entre l'extrait et l'eau distillée concernant la perte de masse. Tandis que la libération de calcium par les calculs est bien plus significative dans l'extrait que dans l'eau distillée. On note que dans tous les cas, les calculs dans l'eau distillée libèrent du calcium avec pratiquement la même constante de vitesse. Par contre, dans l'extrait la cinétique demeure identique pour les calculs et se distingue par la présence de deux étapes successives d'ordre un ensuite d'ordre zéro.

Mots clés : cristallisation oxalocalcique, *Nigella sativa*, Vitamine C, calcul rénal, lithiase.

Summary

In this work, we got interested in the effect of natural substances on the calcium oxalate crystallization, which the frequency is high in urinary calculi and urine of lithiasis subjects.

The in vitro study showed us that the infusion extract of *Nigella sativa* has applied a considerable power on the size of calcium oxalate crystals. Also, the time of germination has been postponed and a change of phase from monohydrated calcium oxalate to dihydrated calcium oxalate occurred.

The inhibition of calcium oxalate particles by fruit juices rich of vitamin C (orange, green lemon, yellow lemon and grapefruit) can be the consequence of a modification of the crystalline phase from whewellite to whedellite. However, the vitamin C in pill and the pure ascorbic acid did not have the expected results.

The study on the determination of calcium oxalate monohydrated aggregates of great size has given a model that responds to this condition. The latter has been chosen to study the effect of natural substances that are yellow lemon, vinegar and *Nigella sativa* on the size of the aggregate. Important rates of dissolution have been observed and the major effect comes back caused by lemon juice, with an increase to the number of cracked crystals in the extremities or even broken. As of *Nigella sativa*, we can conclude that its effect has been positive on the aggregates.

Finally, the results obtained the dissolution of calcium oxalate calculi by the *Nigella sativa* extract on the chosen experimental period has not made a difference between the excerpt and the distilled water concerning the loss of mass. While the release of calcium by the calculi is much more significant in the excerpt than the distilled water. We note that in all cases, the calculi in the distilled water released calcium with almost the same constant of speed. However, in the excerpt, the kinetic remains identical for the calculi and is distinguished by the presence of two successive steps of order one then order zero.

KEYWORDS: oxalocalcic crystallization, *Nigella sativa*, Vitamine C, kidney stone, lithiasis.

ملخص

في عملنا هذا اهتمين في تأثير المواد الطبيعية على بلورة اوكسالات الكالسيوم نسبتها عالية في الحصة الكلوية والبول عند امراض داء الحصاة البولية.

بيّنت دراسة في المختبر أن مستخلص حبة البركة قد مارس قوة كبيرة على حجم بلورات أكسالات الكالسيوم. أيضا ، تم تغيير وقت الإنبات و حدث تغير طور من اوكسالات الكالسيوم أحادي الهيدرات إلى اوكسالات الكالسيوم ثنائي الهيدرات.

قد يكون تثبيط جزيئات أكسالات الكالسيوم بعصائر الفاكهة الغنية بفيتامين C (البرتقال والليمون والجريب فروت) نتيجة لتغير طور البلورة من whewellite إلى whedellite. من ناحية أخرى ، لم يكن لفيتامين C و لحمض الأسكوربيك النقي النتائج المتوقعة.

أعطت الدراسة على تحديد agrégats أكسالات الكالسيوم احادية الماء كبيرة الحجم نموذجًا يلبي هذه الحالة. تم اختيار هذا الأخير لدراسة تأثير المواد الطبيعية مثل الليمون والخل و حبة البركة على حجم agrégats. وقد لوحظت معدل تثبيط كبيرة وكان التأثير الرئيسي على عصير الليمون، مع زيادة في عدد البلورات المتشقة في النهايات أو حتى المكسور. أما بالنسبة إلى حبة البركة، فيمكن استنتاج أن تأثيرها كان إيجابياً.

وأخيرا فإن النتائج التي تم الحصول عليها خلال الفترة التجريبية، من انحلال حصى الكلى أكسالات الكالسيوم بواسطة مستخلص حبة البركة المختارة ، لم تعط فرقا بين المستخلص والماء المقطر فيما يتعلق بفقدان الكتلة. يعتبر إطلاق الكالسيوم بالحصى الكلى أكثر أهمية في المستخلص منه في الماء المقطر. نلاحظ أنه في جميع الحالات، فإن حصى الكلى في الماء المقطر تحرر الكالسيوم مع نفس ثابت السرعة تقريبا. من ناحية أخرى في المستخلص تبقى الحركية متماثلة حصى الكلى ويتم تمييزها عن طريق وجود مرحلتين متتاليتين من رتبة الأولى ثم من رتبة الصفر.

الكلمات المفتاحية :بلورة اوكسالات الكالسيوم، حبة البركة، فيتامينC، الحص الكلوي، داء الحصاة

البولية.

Sommaire

Introduction générale

Chapitre I : La lithiase urinaire	1
1. Introduction.....	1
2. La lithogenèse.....	1
3. Etapes de la lithogenèse.....	1
3.1. Sursaturation.....	1
3.2. Nucléation.....	2
3.3. Croissance cristalline.....	2
3.4. Agrégation cristalline.....	3
3.5. Rétention des particules cristallines.....	3
3.6. Croissance du calcul.....	3
3.7. Conversion cristalline.....	3
4. Promoteurs, inducteurs et inhibiteurs urinaires.....	4
5. Influence du pH urinaire sur la lithogenèse.....	5
6. Anomalies morfo-anatomiques des voies urinaires.....	6
7. Facteurs nutritionnels.....	6
8. Lithiase oxalocalcique.....	6
8.1. Phases cristallines de l'oxalate de calcium.....	6
8.1.1. Oxalate de calcium monohydraté.....	7
8.1.2. Oxalate de calcium dihydraté.....	7
8.2. Facteurs de risque métaboliques.....	8
8.2.1. La dilution insuffisante des urines.....	9
8.2.2. Hypercalciurie.....	9
8.2.3. Hyperoxalurie.....	9
8.2.4. Hypocitraturie.....	9
8.2.5. Facteurs nutritionnels.....	10
8.3. Modèles d'études de la cristallisation de l'oxalate de calcium.....	11
8.4. Modèles d'études des inhibiteurs de la cristallisation de l'oxalate de calcium.....	11
8.4.1. Modèles d'étude des inhibiteurs en solution aqueuse.....	12

8.4.2. Autres modèles d'étude des inhibiteurs.....	13
8.5. Turbidimétrie.....	13
9. Phytothérapie.....	14
Bibliographie.....	15
Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium.....	20
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de <i>Nigella sativa</i>.....	20
1. Introduction.....	20
2. Matériels et méthodes.....	21
2.1. Plante.....	21
2.1.1. Caractéristiques botaniques.....	21
2.1.2. Principaux composants.....	21
2.1.3. Utilisation.....	21
2.2. Préparation de <i>Nigella sativa</i>	21
2.3. Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence et en présence de <i>Nigella sativa</i>	22
2.3.1. Cristallisation en absence de <i>Nigella sativa</i>	22
2.3.2. Cristallisation en présence <i>Nigella sativa</i>	22
2.4. Etude morphologique.....	23
2.5. Allure de la courbe et critères régissant l'expérimentation.....	23
2.6. Mesure de quantité de calcium et d'oxalate.....	24
2.6.1. Mesure de l'oxalate.....	24
• Principe.....	24
• Mode de travail.....	25
• Méthode de dosage.....	25
• Calcul de la teneur en acide oxalique.....	25
2.6.2. Mesure du calcium.....	25
2.7 Analyse Infrarouge à transformé de Fourier.....	27
2.8. Observation au Microscope à balayage électronique.....	27
3. Résultats.....	28
3.1. Cristallisation en absence <i>Nigella sativa</i>	28
3.1.1. Analyse par microscope optique.....	28
3.1.2. Etude morphologique.....	30
3.1.3. Analyse infrarouge à transformé de Fourier.....	30
3.2. Cristallisation en présence <i>Nigella sativa</i>	32

3.2.1.	Analyse par microscope optique.....	32
3.2.2.	Etude morphologique.....	35
3.2.3.	Comparaison des taux d'inhibition des différentes concentrations de <i>Nigella sativa</i> ..	36
3.2.4.	Analyse infrarouge à transformé de Fourier.....	37
3.2.5.	Mesure de quantité de calcium et d'oxalate.....	40
3.2.6.	Observation au microscope à balayage électronique.....	41
4.	Discussion.....	42
	Bibliographie	45
	Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium	50
	Partie 2 : L'effet inhibiteur de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium	50
1.	Introduction.....	50
2.	Matériel et méthode.....	51
2.1.	Vitamine C.....	51
2.2.	Préparation des jus de fruit et la vitamine C commerciale et de l'acide ascorbique pur.....	52
2.3.	Teneur en acide ascorbique des jus de fruits	52
2.4.	Inhibition de la cristallisation d'oxalate de calcium par les jus de fruit, la vitamine C commerciale et l'acide ascorbique pur.....	53
3.	Résultats.....	53
3.1.	Teneur en acide ascorbique des jus de fruits.....	53
3.2.	Inhibition de la cristallisation oxalocalcique en présence des jus de fruits, de la vitamine C commerciale et de l'acide ascorbique pur.....	55
3.2.1.	Jus d'orange	55
3.2.1.1.	Analyse par microscope optique.....	55
3.2.1.2.	Etude morphologique.....	57
3.2.1.3.	Analyse infrarouge à transformé de Fourier.....	58
3.2.2.	Jus de citron jaune.....	59
3.2.2.1.	Analyse par microscope optique.....	59
3.2.2.2.	Etude morphologique.....	61
3.2.2.3.	Analyse infrarouge à transformé de Fourier.....	62
3.2.3.	Jus de citron vert.....	63
3.2.3.1.	Analyse par microscope optique.....	63
3.2.3.2.	Etude morphologique.....	66
3.2.3.3.	Analyse infrarouge à transformé de Fourier.....	66
3.2.4.	Jus de Pamplemousse.....	67

3.2.4.1.	Analyse par microscope optique.....	67
3.2.4.2.	Etude morphologique.....	69
3.2.4.3.	Analyse infrarouge à transformé de Fourier.....	71
3.2.5.	Comparaison entre les jus de fruits.....	71
3.2.6.	La Vitamine C commerciale.....	73
3.2.6.1.	Analyse par microscope optique.....	73
3.2.6.2.	Etude morphologique.....	75
3.2.6.3.	Analyse infrarouge à transformé de Fourier.....	75
3.2.7.	Acide ascorbique pur.....	76
3.2.7.1.	Analyse par microscope optique.....	76
3.2.7.2.	Etude morphologique.....	78
3.2.7.3.	Analyse infrarouge à transformé de Fourier.....	79
4.	Discussion.....	80
	Bibliographie.....	83
	Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles.....	88
1.	Introduction.....	88
2.	Matériel et méthodes.....	88
2.1.	Préparation du vinaigre et du jus de citron.....	88
2.2.	Préparation de la Plante.....	89
2.3.	Agrégation de l'oxalate de calcium.....	89
2.3.1.	Protocole 1.....	90
2.3.2.	Protocole 2.....	90
2.3.3.	Protocole 3.....	91
2.3.4.	Protocole 4.....	91
2.4.	Dissolution des agrégats de l'oxalate de calcium.....	91
3.	Résultats.....	92
3.1.	Agrégation de l'oxalate de calcium.....	92
3.1.1.	Protocole 1.....	92
✓	Mélange 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) avec 100 ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).....	92
✓	En ajoutant une solution de 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 1 mmol/l, à 4 mmol/l et 16 mmol/l.....	93
3.1.2.	Protocole 2.....	96
✓	Mélange 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) avec 150 ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).....	96
✓	En ajoutant 0,588 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	97

✓	En ajoutant 0,268 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	99
✓	En ajoutant 1,126 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ et 4,704 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	100
3.1.3.	Protocole 3.....	102
✓	En mélangeant 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) avec 100 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l).....	102
✓	En ajoutant une solution de 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 4 mmol/l.....	103
✓	En ajoutant une urine lithiasique diluée à 10% (v/v) et 20% (v/v).....	105
3.1.4.	Protocole 4.....	107
✓	En ajoutant 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 10 mmol/l avec 150 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 40 mmol/l.....	107
✓	En ajoutant 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 4 mmol/l avec 150 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 10 mmol/l	108
3.2.	Morphologie des agrégats.....	111
3.3.	Analyse infrarouge à transformer de Fourier.....	112
3.4.	Dissolution des agrégats de la whewellite.....	113
3.4.1.	Dissolution des agrégats de Whewellite par le vinaigre.....	113
3.4.1.1.	Analyse par microscope optique.....	113
3.4.1.2.	Etude morphologique.....	115
3.4.2.	Dissolution des agrégats de la whewellite par le jus de citron.....	116
3.4.2.1.	Analyse par microscope optique.....	116
3.4.2.2.	Etude morphologique.....	118
3.4.3.	Comparaison de la dissolution entre le jus de citron et le vinaigre.....	120
3.4.4.	Dissolution des agrégats de la whewellite par <i>Nigella sativa</i> en infusion.....	120
3.4.4.1.	Analyse par microscope optique.....	120
3.4.4.2.	Etude morphologique.....	122
4.	Discussion.....	123
	Bibliographie	127
	Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de <i>Nigella Sativa</i>	130
1.	Introduction.....	130
2.	Matériel et méthodes.....	131
2.1.	Dissolution des calculs.....	131
2.2.	Libération de calcium.....	132
2.3.	Etude cinétique.....	132

3.	Résultats.....	133
3.1.	Dissolution des calculs.....	133
3.1.1.	Série I.....	134
3.1.2.	Série II.....	134
3.1.3.	Série III.....	134
3.1.4.	Série IV.....	134
3.2.	Libération du calcium.....	136
3.2.1.	Série I.....	136
3.2.2.	Série II.....	137
3.2.3.	Série III.....	137
3.2.4.	Série IV.....	137
3.3.	Etude cinétique.....	140
4.	Discussion.....	143
	Bibliographie.....	146

Conclusion générale

Liste des Figures

Chapitre I : La lithiase urinaire

Figure 1 : Les étapes de la lithogénèse.....	4
Figure 2 : Oxalate de calcium monohydraté (whewellite)	7
Figure 3 : Oxalate de calcium dihydraté (weddelite).....	7

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1: Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Figure 4 : Fleurs et graines de <i>Nigella sativa</i>	21
Figure 5 : Modèle de cristallisation oxalocalcique <i>in-vitro</i>	23
Figure 6 : Allure générale de la courbe de cristallisation oxalocalcique.....	24
Figure 7 : Electrode spécifique de calcium.....	26
Figure 8 : Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.....	27
Figure 9 : Microscope à balayage électronique.....	28
Figure 10 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté en fonction du temps et en absence d'inhibiteur.....	29
Figure 11 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence de <i>Nigella sativa</i> en infusion.....	34
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'électrode spécifique de l'ion Ca^{+2}	40
Figure 13 : Photos MEB de (a) cristallisation sans inhibiteur (b) à la concentration de NS 5% (v/v), (c) à la concentration de NS 80% (v/v) et (d) à la concentration de NS 100% (v/v).	41

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2: L'effet inhibiteur de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Figure 14 : fruits testés (a): Orange, (b): Citron Jaune, (c): Citron Vert, (d): Pamplemousse.....	52
Figure 15 : (a) : Vitamine C commerciale, (b) : Acide ascorbique pur.....	52
Figure 16 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus d'orange.	56
Figure 17 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus de citron jaune.	60
Figure 18 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus de citron vert.....	64

Figure 19 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus de pamplemousse.....	68
Figure 20 : Taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en fonction de différentes concentrations des jus de fruits	72
Figure 21 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence de la vitamine C.commerciale.....	74
Figure 22 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence d'acide ascorbique.....	77

Chapitre III: Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Figure 23 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps de la cristallisation de 100ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 100ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).....	92
Figure 24 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 1mM, 4 mM et 16 mM de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	94
Figure 25 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps de la cristallisation de 150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 150ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).....	96
Figure 26 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 0,588 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	98
Figure 27 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 0,268g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	99
Figure 28 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 1,126 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ et 4,704 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	101
Figure 29 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) et $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l).....	102
Figure 30 : Taille maximale des agrégats d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence de 4mM de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	104
Figure 31 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 10% (v/v) et 20% (v/v) d'urines lithiasiques diluées.....	105
Figure 32 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps de la cristallisation de 150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (10 mmol/l) et 150ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l).....	107
Figure 33 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps de la cristallisation de 150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) et $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol/l).....	109
Figure 34 : Taille des agrégats de whewellite en présence de vinaigre à différentes concentrations.....	114
Figure 35: Taille des agrégats de whewellite en présence de jus de citron à différentes concentrations.....	117
Figure 36 : Taille des agrégats de whewellite en présence de <i>Nigella sativa</i> en infusion.....	121

Figure 37 : Etapes de la dissolution des agrégats de whewellite de 5% (v/v), 10% (v/v), 25% (v/v) et 50% du citron et du vinaigre.....125

Chapitre IV: Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

Figure 38 : Série I : IIa associée à Ia et IVa (en trace); série II : IIa associée à Ia et IVa; série III : Ia associée à IVa, whitlockite et nitrates et série IV : Ia associé à IVa, et protéines.....133

Figure 39 : Spectre IRTF (série I) wheddellite associée à whewellite et la carbapatite (en trace), (série II) wheddellite associé à whewellite et carbapatite, (série III) whewellite associée à carbapatite, whitlockite et nitrates et (série IV) whewellite associé à carbapatite et protéines.....135

Figure 40 : Courbe d'étalonnage de l'électrode spécifique de l'ion Ca^{+2}136

Figure 41 : Quantité de Ca^{+2} libéré par les calculs dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa* et l'eau distillée durant 84 jours.....138

Figure 42 : Evolution de pH de l'extrait de plante et l'eau distillée en présence des calculs oxalo-calciques.....139

Figure 43 : Evolution cinétique des série I, II, III et IV dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa*.141

Figure 44 : Evolution cinétique des série I, II, III et IV dans l'eau distillée.....142

Liste des Histogrammes

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1: Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Histogramme 1 : Taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en fonction des différentes concentrations de *Nigella sativa*.37

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2: L'effet inhibiteur de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Histogramme 2: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus d'orange.57

Histogramme 3: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de citron jaune.61

Histogramme 4: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de citron vert.65

Histogramme 5: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de pamplemousse.69

Histogramme 6: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence de la vitamine C commerciale.74

Histogramme 7 : Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence d'acide ascorbique pur.78

Chapitre III: Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Histogramme 8. Variation du taux de dissolution des agrégats des oxalates de calcium monohydratés en présence du vinaigre.114

Histogramme 9. Variation du taux de dissolution des agrégats des oxalates de calcium monohydratés en présence du jus de citron.118

Histogramme 10 : Comparaison des taux de dissolution des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté par le vinaigre et le jus de citron.120

Histogramme 11 : Variation du taux de dissolution des agrégats des oxalates de calcium monohydratés en présence de *Nigella sativa* en infusion.122

Liste des Photographies

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1: Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Photographie 1 : Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	30
Photographie 2 : Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200	35
Photographie 3 : Cristallisation en présence de l'extrait de <i>Nigella</i> 4% (v/v) à t=1200 s.....	36
Photographie 4 : Cristallisation en présence de l'extrait de <i>Nigella</i> 5% (v/v) à t=1200 s	36
Photographie 5 : [Cristallisation en présence de l'extrait de <i>Nigella</i> 100% (v/v) à t=1200 s.....	36

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2: L'effet inhibiteur de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Photographie 6 : Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	57
Photographie 7 : Cristallisation en présence du jus d'orange 10% (v/v) à t=1200 s.....	57
Photographie 8 : Cristallisation en présence du jus d'orange 50% (v/v) à t=1200 s.....	57
Photographie 9 : Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	58
Photographie 10 : Cristallisation en présence du jus d'orange 25% (v/v) à t=1200 s.....	58
Photographie 11: Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	62
Photographie 12 : Cristallisation en présence du jus de citron jaune 10% (v/v) à t=1200 s.....	62
Photographie 13 : Cristallisation en présence du jus de citron jaune 50% (v/v) à t=1200 s.....	62
Photographie 14: Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	66
Photographie 15: Cristallisation en présence du jus de citron vert 50% (v/v) à t=1200 s.....	66
Photographie 16: Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	70
Photographie 17: Cristallisation en présence du jus de pamplemousse 50% (v/v) à t=1200 s.....	70
Photographie 18: Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	70
Photographie 19: Cristallisation en présence du jus de pamplemousse 50% (v/v) à t=1200 s.....	70
Photographie 20: Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	75
Photographie 21: Cristallisation en présence de la vitamine C commerciale 2g/100ml à t=1200 s.	75
Photographie 22: Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.....	79
Photographie 23: Cristallisation en présence de l'acide ascorbique pur 2g/100ml à t=1200 s.....	79

Chapitre III: Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Photographie 24 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=1mM et [Ca ⁺²]=4mM) à t= 60 min.....	93
Photographie 25 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=1mM et [Ca ⁺²]=4mM) à t= 60 min en ajoutant [Na ₂ C ₂ O ₄] = 1mM.....	95
Photographie 26 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=1mM et [Ca ⁺²]=4mM) à t= 10 min en ajoutant [Na ₂ C ₂ O ₄] = 4mM.....	95
Photographie 27 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=1mM et [Ca ⁺²]=4mM) à t= 5 min en ajoutant [Na ₂ C ₂ O ₄] = 16mM.....	95
Photographie 28 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=1mM et [Ca ⁺²]=4mM) à t= 30 min.....	97
Photographie 29 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=1mM et [Ca ⁺²]=4mM) en ajoutant 0,558g calcium à t= 25 min.....	98
Photographie 30 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=1mM et [Ca ⁺²]=4mM) en ajoutant 0,268g oxalate à t= 45 min.....	100
Photographie 31 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=1mM et [Ca ⁺²]=4mM) en ajoutant 1,126g Ox et 4,704g Ca ⁺² et à t= 90 min.....	101
Photographie 32 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=40mM) à t= 10 min..	103
Photographie 33 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=40mM) en ajoutant [Na ₂ C ₂ O ₄] = 4mM à t= 10 min.....	104
Photographie 34 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=40mM) à t= 10 min [urine 10% (v/v)].....	106
Photographie 35 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=40mM) à t= 5 min [urine 20% (v/v)].....	106
Photographie 36 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=10mM et [Ca ⁺²]=40mM) à t= 30 min.	108
Photographie 37 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=10mM) à t= 120 min..	109
Photographie 38 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=10mM) à t= 120 min.	111
Photographie 39 : Cristal d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=10mM) à t= 120 min...	111
Photographie 40 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=10mM) à t= 120 min.	115
Photographie 41 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du vinaigre 5% (v/v) à t= 120 min.....	115
Photographie 42 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du vinaigre 10% (v/v) à t= 120 min.....	115
Photographie 43 : Agrégat d'oxalate de calcium en presence du vinaigre 25% (v/v) à t= 120 min.....	116
Photographie 44 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du vinaigre 50% (v/v) à t= 120 min.....	116
Photographie 45: Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca ⁺²]=10mM) à t= 120 min.	119

Photographie 46 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus de citron 5% (v/v) à t= 120 min.....	119
Photographie 47 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus de citron 10% (v/v) à t= 120 min.....	119
Photographie 48 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus de citron 25% (v/v) à t= 120 min.....	119
Photographie 49 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus de citron 50% (v/v) à t= 120 min.....	119
Photographie 50 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus de citron 25% (v/v) à t= 60 min.....	119
Photographie 51 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca+2]=10mM) à t= 120 min.....	122
Photographie 52 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence de Nigella sativa 2g/100ml à t= 120 min.....	123
Photographie 53 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence de Nigella sativa 4g/100ml à t= 120 min.....	123

Liste des Spectres

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1: Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Spectre 1 : Spectre infrarouge de référence de l'oxalate de calcium monohydraté	31
Spectre 2: S Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur (whewellite).....	32
Spectre 3 : Spectre infrarouge de référence de l'oxalate de calcium dihydraté	38
Spectre 4: Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de <i>Nigella sativa</i> 5% (v/v) de composition weddellite.....	39
Spectre 5: Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de <i>Nigella sativa</i> 100% (v/v) de composition weddellite.....	39

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2: L'effet inhibiteur de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Spectre 6 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence du jus d'orange 50% (v/v) de composition weddellite + whewellite (traces).....	59
Spectre 7 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence du jus de citron jaune 50% (v/v) de composition weddellite.....	63
Spectre 8 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence du jus de citron vert 50% (v/v) de composition weddellite.....	67
Spectre 9 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence du jus de pamplemousse 50% (v/v) de composition whewellite.....	71
Spectre 10 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de la vitamine C commerciale 2g/100ml de composition whewellite.....	76
spectre 11: Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence d'acide ascorbique pur 2g/100ml de composition whewellite.....	80

Chapitre III: Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Spectre 12 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium de whewellite	112
---	-----

Liste des Tableaux

Chapitre I : La lithiase urinaire

Tableau 1 : Domaine usuel de pH favorisant la précipitation des principales espèces cristallines observées dans les urines (16).....	6
Tableau 2 : Promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation de l'oxalate de calcium (24).	8
Tableau 3 : Rôle des habitudes alimentaires dans la lithogène (27).....	10

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1: Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Tableau 4 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium pendant 1200s de cristallisation sans d'inhibiteur	29
Tableau 5: Principales fréquences de vibrations de la whewellite (spectre de référence 1).....	31
Tableau 6 : Evolution de la taille des cristaux d'oxalate de calcium en présence de <i>Nigella sativa</i> en infusion pendant 1200s de cristallisation.	33
Tableau 7 : Mesure du pH de la cristallisation pour différentes concentrations de <i>Nigella sativa</i>	35
Tableau 8: Principales fréquences de vibrations de la weddellite (spectre de référence 3).....	38
Tableau 9. Le potentiel des solutions CaCl ₂ en fonction de la concentration de calcium.....	40
Tableau 10 : Taux de calcium et d'oxalate de <i>Nigella sativa</i>	40

Chapitre II: Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2: L'effet inhibiteur de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Tableau 11 : Teneur en vitamines C des agrumes testés.....	54
Tableau 12 : Concentration de la vitamine C en mg/100ml et mg/l des différents agrumes.	54
Tableau 13 : Le pH et la masse de la vitamine C commerciale et de l'acide ascorbique pur.	55
Tableau 14 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus d'orange à différentes concentrations pendant 1200s de cristallisation.....	55
Tableau 15 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de citron jaune à différentes concentrations pendant 1200s de cristallisation.	60
Tableau 16 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de citron vert à différentes concentrations pendant 1200s de cristallisation.....	64
Tableau 17: Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de pamplemousse à différentes concentrations pendant 1200s de cristallisation.....	68
Tableau 18: Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence de la vitamine C commerciale pendant 1200s de cristallisation.....	73

Tableau 19: Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence d'acide ascorbique pur pendant 1200s de cristallisation.....77

Chapitre III: Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Tableau 20 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation de 100ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1mmol/l) 100ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4mmol).....92

Tableau 21 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation en ajoutant 1mM, 4 mM et 16 mM de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$94

Tableau 22 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de la cristallisation de 150ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1mmol/l) 150ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4mmol).....96

Tableau 23 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation en ajoutant 0,588 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$97

Tableau 24 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de la cristallisation en ajoutant 0,268 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$99

Tableau 25 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de la cristallisation en ajoutant 1,126 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ et 4,704 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$100

Tableau 26 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 180 minutes de cristallisation de 100ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4mmol/l) 100ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40mmol).....102

Tableau 27 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 180 minutes de cristallisation en ajoutant 4 mM de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$103

Tableau 28 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 180 minutes de cristallisation en ajoutant 10% (v/v) et 20%(v/v) des urines lithiasiques diluées.....105

Tableau 29 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation de 150ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (10mmol/l) 150ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40mmol).....107

Tableau 30 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 120 minutes de cristallisation de 150ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4mmol/l) 150ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (10mmol).....108

Tableau 31 : Récapitulatif de l'effet des substances promotrices sur la taille des agrégats des oxalates de calcium.....110

Tableau 32 : pH des trois substances.....112

Tableau 33 : Evolution de la taille maximale des agrégats de whewellite en présence du vinaigre à différentes concentrations volumiques.....113

Tableau 34. Evolution de la taille maximale des agrégats de whewellite en présence de jus de citron à différentes concentrations volumiques.....117

Tableau 35 : Variation de la taille moyenne des agrégats de whewellite en présence de *Nigella sativa* en infusion.....121

Chapitre IV: Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

Tableau 36 : Information sur les calculs utilisés.....	131
Tableau 37 : Taux de calcium libéré par les calculs immergés dans l'extrait de <i>Nigella sativa</i> et l'eau distillée.....	140
Tableau 38 : Loi cinétique et constante des vitesses.....	143



Introduction générale

Introduction générale

La lithiase urinaire est une affection fréquente qui touche selon les pays, 4 à 20% de la population (1-6). Elle évolue sans cesse tant du point de vue de ses caractéristiques épidémiologiques que de ses facteurs étiologiques (7). Des études ont montré que la fréquence de la lithiase dans les pays industrialisés (8-10) augmente parallèlement avec l'élévation du niveau de vie. Elle semble évoluer aussi dans les pays en développement (7), comme il a été prouvé par l'étude faite par Djelloul et al (11). C'est une maladie qui s'affirme de plus en plus comme un marqueur socio-économique révélateur de nos conditions de vie et de nos habitudes alimentaires (1). D'autres études épidémiologiques indiquent que de nombreux facteurs tels que l'âge, l'industrialisation, l'alimentation et l'environnement, influencent sur la lithiase urinaire (12). Le changement de régime avec l'augmentation d'acide gras, des protéines animales, du sucre et la diminution des apports hydriques favorise cette maladie. Ajoutons que cette maladie est aussi issue de diverses causes telles que l'infection urinaire, les maladies intestinales, le métabolisme, les médicaments, les malformations anatomiques de l'appareil urinaire (11, 13, 14). Trouver les causes de la lithiase permet de lui opposer des mesures thérapeutiques ou diététiques efficaces conduisant à la réduction ou à l'arrêt de la récurrence du calcul (1), principal témoin de la pathologie.

Le calcul est un produit dont le caractère récidivant doit inciter à le soumettre à une enquête étiologique basée sur un bilan biologique orienté, un examen de sa structure et une détermination de sa composition quantitative et qualitative (15, 16). Les composés chimiques associés à la plus grande prévalence sont les oxalates de calcium (monohydraté et dihydraté), les acides uriques (anhydre ou dihydraté) et la struvite (16). Chacun de ces constituants peut présenter différentes morphologies et couleurs qui peuvent être rattachées à des environnements biochimiques particuliers (17, 18) et à des causes spécifiques (19). Actuellement, la composition des calculs se caractérise par une progression de la proportion des calculs majoritaires en oxalate de calcium (20). Cette prédominance est observée dans des études faites à l'Ouest et à l'est de l'Algérie (11, 20).

Les calculs urinaires sont formés de substances qui se cristallisent dans les urines dans un ensemble de processus appelé lithogénèse. Cette dernière relève d'un mécanisme multifactoriel complexe de la lithiase, elle comporte plusieurs phases qui s'expriment successivement ou simultanément. La sursaturation en une ou plusieurs substances cristallines

Introduction générale

est l'étape fondamentale dans ce processus. Lorsque le niveau de celle-ci est suffisant, les molécules dissoutes se rassemblent pour constituer des germes cristallins qui naissent, croissent et s'agglomèrent pour progressivement grandir sous la forme de calcul urinaire (21, 22). Les différentes étapes de la lithogenèse traduisent souvent un déséquilibre urinaire entre les promoteurs tels que le calcium, l'oxalate, le phosphate, l'ammonium, l'urate et l'acide urique et les inhibiteurs de la cristallisation notamment le citrate et le magnésium (23, 24). Un ralentissement ou une élimination d'une ou plusieurs étapes du processus lithogenèse sera un moyen thérapeutique susceptible de réduire la formation de cristaux dans l'urine (25). De manière générale, les inhibiteurs peuvent empêcher ou ralentir la cristallisation en formant des espèces chimiques solubles qui vont réduire le risque de cristallisation ou vont se fixer à la surface des germes cristallins pour ne pas les laisser grossir ou s'agréger. Leurs présences dans l'urine de faibles poids moléculaires ou de hauts poids moléculaires jouent un rôle majeur dans la prévention de la lithogenèse (26).

L'étude de la cristallisation d'oxalate de calcium joue un rôle important dans la recherche sur la lithiase urinaire, non seulement pour son intérêt théorique, mais aussi pour son importance biologique. De nombreuses méthodes *in vitro* ont été utilisées pour étudier le processus de cristallisation et d'inhibition de l'oxalate de calcium par des plantes (27-30).

Bien que des progrès aient été réalisés, les médicaments utilisés jusqu'à présent ne peuvent satisfaire totalement au traitement de cette maladie, car leurs effets restent limités. En contrepartie, la nature offre des matières premières abondantes et variées généralement bien tolérées par l'organisme humain quand on en fait un bon usage. C'est pourquoi les substances naturelles en particulier les plantes médicinales peuvent être une thérapie alternative. Toutefois, malgré leurs diversités, leurs potentialités thérapeutiques restent à découvrir. La science d'aujourd'hui recherche dans ce domaine pour lutter au mieux contre les diverses maladies sans que pour cela cause des effets secondaires.

Notre travail est constitué de quatre grands chapitres :

Le **premier chapitre** est consacré à l'étude bibliographique et comporte les étapes de la lithogenèse et les facteurs de risque d'une lithiase oxalocalcique. **Le deuxième chapitre** est subdivisé en deux sous chapitres : **Partie 1** : La plante *Nigella sativa* a été préparée, à différentes concentrations par plusieurs modes et testées sur notre urine artificielle d'oxalate de calcium. **Partie 2** : Cette partie se rapporte sur l'effet inhibiteur de quelques jus de fruits, de la vitamine C commerciale et de l'acide ascorbique pur à différentes concentrations sur la cristallisation oxalocalcique *in vitro*. Quant au **troisième chapitre**, tout d'abord il consiste à trouver des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté de grande taille en changeant les

Introduction générale

concentrations des solutés cristallisables, ensuite on décrit l'effet de quelques substances naturelles sur les agrégats choisis précédemment. Enfin dans le **dernier chapitre**, on s'est intéressé à étudier l'effet dissolutif de *Nigella sativa*, sur les calculs d'oxalate de calcium monohydraté (Whewellite) et dihydraté (Whedellite) *in vitro* et la cinétique de libération du calcium libéré par ces calculs.

Références bibliographiques

1. Oussama A, Kzaiber F, Mernari B, Hilmi A, Semmoud A, Daudon M. Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans le Moyen Atlas marocain par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. *Progrès en Urologie*. 2000;10(3):404-10.
2. Sharma D, Dey YN, Sikarwar I, Sijoria R, Wanjari MM, Jadhav AD. In vitro study of aqueous leaf extract of *Chenopodium album* for inhibition of calcium oxalate and brushite crystallization. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2016;3(2):164-71.
3. Johnson CM, Wilson DM, O'Fallon WM, Malek RS, Kurland LT. Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kidney international*. 1979;16(5):624-31.
4. Asper R. Epidemiology and socioeconomic aspects of urolithiasis. *Urological research*. 1984;12(1):1-5.
5. Trinchieri A, Coppi F, Montanari E, Del Nero A, Zanetti G, Pisani E. Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years. *European urology*. 2000;37(1):23-5.
6. Hesse A, Brändle E, Wilbert D, Köhrmann K-U, Alken P. Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000. *European urology*. 2003;44(6):709-13.
7. Daudon M, Traxer O, Lechevallier E, Saussine C. Épidémiologie des lithiases urinaires. *Progrès en urologie*. 2008;18(12):802-14.
8. Almby B, Meirik O, Schönebeck J. Incidence, Morbidity and Complications of Renal and Ureteral Calculi A Well Defined Geographical Area. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 1975;9(3):249-53.
9. Ljunghall S, Hedstrand H. Epidemiology of renal stones in a middle-aged male population. *Acta Medica Scandinavica*. 1975;197(1-6):439-45.
10. Hedenberg I. Renal and ureteral calculi, a study of the occurrence in Sweden during 1911-1938 with some notes on the geographical distribution. *Acta Chirurgica Scandinavica*. 1951;101(1):17-36.
11. Djelloul Z, Djelloul A, Bedjaoui A, Kaid-Omar Z, Attar A, Daudon M, et al. Lithiase urinaire dans l'Ouest algérien: Etude de la composition de 1354 calculs urinaires en relation avec leur localisation anatomique, l'âge et le sexe des patients. *Progrès en urologie*. 2006;16(3):328.

Introduction générale

12. Durgawale P, Shariff A, Hendre A, Patil S, Sontakke A. Chemical analysis of stones and its significance in urolithiasis. *Biomedical Research*. 2010;21(3).
13. El Habbani R, Chaqroune A, Houssaini TS, Arrayhani M, El Ammari J, Dami F, et al. Étude épidémiologique sur les calculs urinaires dans la région de Fès et sur le risque de récurrence. *Progrès en urologie*. 2016;26(5):287-94.
14. Daudon M, Jungers P. Drug-induced renal calculi. *Drugs*. 2004;64(3):245-75.
15. Khaled S. Composition phytochimique et effet, in vitro, des extraits de quelques plantes médicinales du sud ouest Algérien sur la cristallisation lithiasique oxalo-calcique: Université El Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès.
16. Hannache B. La lithiase urinaire: Épidémiologie, rôle des éléments traces et des plantes médicinales: Paris 11; 2014.
17. Daudon M, Jungers P, Traxer O. Lithiase urinaire: Lavoisier; 2012.
18. Daudon M, Bader C, Jungers P. Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microscopy*. 1993;7(3):1081-106.
19. Ceballos-Picot I, Perignon J, Hamet M, Daudon M, Kamoun P. 2, 8-Dihydroxyadenine urolithiasis, an underdiagnosed disease. *Lancet (London, England)*. 1992;339(8800):1050.
20. Bouslama S, Boutefnouchet A, Hannache B, Djemil T, Kadi A, Dahdouh A, et al. Détermination de la composition de 359 calculs du haut appareil urinaire collectés dans la région Est-algérien. *Progrès en urologie*. 2016;26(1):41-9.
21. Daudon M, Cohen-Solal F, Jungers P. Mécanismes de la lithogénèse et de la cristallurie. *Biologie & Santé*. 2000;1(1):51-3.
22. Fondamentales N. Exploration métabolique de la lithiase oxalo-calcique urinaire. Les indicateurs du risque lithogène: Modalités, applications et perspectives. *Progrès en Urologie*. 1996;6:44-51.
23. Daudon M, Hennequin C, Bader C, Jungers P, Lacour B, Druke T. Inhibiteurs de cristallisation dans l'urine. *Actualités néphrologiques Jean Hamburger*. 1994:165-220.
24. Jungers P, Daudon M. Démarche diagnostique devant une lithiase rénale. *Médecine thérapeutique*. 2000;5(10):785-90.
25. Sbahi K. Etude épidémiologique, paramétrique et phytothérapeutique de la lithiase urinaire 2017.
26. Berland Y. La lithiase urinaire oxalo-calcique idiopathique: Nouvelles approches physiopathologiques. *Néphrologie*. 1999;20(7):363-9.

Introduction générale

27. Atmani F, Khan S. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Bju International*. 2000;85(6):621-5.
28. Joshi V, Parekh B, Joshi M, Vaidya A. Herbal extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata* inhibit growth of calcium oxalate monohydrate crystals in vitro. *Journal of Crystal Growth*. 2005;275(1-2):e1403-e8.
29. Aggarwal A, Tandon S, Singla S, Tandon C. Diminution of oxalate induced renal tubular epithelial cell injury and inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by aqueous extract of *Tribulus terrestris*. *International braz j urol*. 2010;36(4):480-9.
30. Sadki C, Atmani F. Évaluation de l'effet antilithiasique, oxalo-calcique et phospho-ammoniac-magnésien d'extrait aqueux d'*Erica multiflora* L. *Progrès en Urologie*. 2017;27(16):1058-67.



Chapitre I

La lithiase urinaire

Chapitre I : La lithiase urinaire

1. Introduction

Le terme de lithiase urinaire, du grec « lithos » désigne la maladie caractérisée par la formation ou la présence de calcul dans les reins ou les voies urinaires. C'est une pathologie fréquente et récidivante. Ces dernières années, les caractéristiques épidémiologiques de la lithiase urinaire ont beaucoup évolué. C'est une conséquence logique des modifications des habitudes nutritionnelles, des facteurs d'environnement, des conditions sanitaires et de la prévalence des affections qui prédisposent au risque de la lithiase (obésité, syndrome métabolique, diabète) (1).

La formation d'un calcul est une succession d'étapes dont le déroulement dépend de plusieurs facteurs tels que la sursaturation. Le rein produit des urines sursaturées en plusieurs solutés cristallisables dont la concentration est supérieure au produit de solubilité, c'est le cas de l'oxalate et du calcium (2-4). Ceci ne conduit pas nécessairement à la formation des cristaux, car les urines contiennent des substances qu'on appelle « inhibiteurs de cristallisation » qui contrebalance l'action des promoteurs, empêchant ou réduisant la précipitation de l'oxalate de calcium (5-8).

2. La lithogénèse

La lithogénèse désigne l'ensemble des mécanismes physico-chimiques et biologiques qui conduisent de la sursaturation des urines à la formation d'un calcul. Elle se traduit par une cascade d'évènements parfois très espacés et parfois au contraire très rapprochés dans le temps. Elle comporte plusieurs phases qui s'expriment successivement ou simultanément.

3. Etapes de la lithogénèse

Le processus de la lithogénèse peut être décomposé en plusieurs étapes qui se succèdent ou s'entremêlent au cours de la formation d'un calcul (figure 1).

Elles sont décrites ci-dessous :

3.1. Sursaturation

La sursaturation urinaire est un des principaux facteurs de la lithogénèse, elle traduit un excès de concentration d'une substance dissoute dans l'urine par rapport aux capacités solvantes

de celle-ci (9). Dans la majorité des cas, elle génère une phase insoluble faite de cristaux et en assure la croissance ultérieure. Dans des conditions physicochimiques définies (température, pression, pH...), une substance cristalline soluble dans un solvant donné, eau ou urine se dissout jusqu'à atteindre une certaine concentration, au-delà de laquelle il y'a dépôt de cristaux.

3.2. Nucléation

La nucléation cristalline ou la germination est le premier stade de particules solides conduisant à la formation de calculs. Lorsque le niveau de sursaturation est suffisant, les molécules dissoutes se rassemblent en quelques secondes pour constituer des germes cristallins par nucléation homogène ou hétérogène (10-13).

La nucléation homogène correspond à la cristallisation directe d'une espèce dont le niveau de sursaturation est élevé, les cristaux d'oxalate de calcium en sont un exemple. Dans le cas où le produit de formation de l'une des substances est atteint, entraînant sa cristallisation dans l'urine, la présence de ces cristaux peut induire la cristallisation d'une seconde espèce pour laquelle le produit de formation n'est pas encore atteint en raison d'une moindre sursaturation (9), on parle alors de germination cristalline par nucléation hétérogène. Cette dernière peut se traduire aussi du fait que les cristaux se forment au contact de particules telles que des débris épithéliaux ou cellulaires jouant le rôle d'inducteurs (14).

3.3. Croissance cristalline

La croissance cristalline se poursuit tant que l'urine reste en état de sursaturation élevée vis-à-vis de l'espèce considérée (figure 1). Les cristaux engendrés sont initialement très petits (<100 nm) et ne constituent pas une menace de lithiase, ils vont ensuite grossir plus ou moins rapidement par captation de nouvelles molécules de la substance sursaturée présentes dans l'urine et former des particules plus grosses (9).

Les ions qui se trouvent à la surface du germe cristallin sont dans des conditions différentes de ceux situés à l'intérieur. Les ions à l'intérieur du germe qui est un petit cristal sont liés dans toutes les directions avec des ions voisins de telle façon que les forces agissant entre elles s'équilibrent réciproquement. Quant aux ions de la couche superficielle, leur équilibre est assuré par des forces dirigées à l'intérieur du germe cristallin et par les forces propres à la surface (15).

3.4. Agrégation cristalline

Cette étape lente (13), semble être un phénomène essentiel à la formation du calcul, du fait qu'elle conduit au regroupement des cristaux en particules plus volumineuses soit par un mécanisme d'attraction électrostatique soit par le biais de liaisons visqueuses avec les macromolécules fortement chargées (16). Plusieurs travaux ont montré que les urines de sujets lithiasiques avaient une moindre aptitude à réduire l'agrégation des cristaux que les urines de sujets normaux (9, 11, 13).

3.5. Rétention des particules cristallines

Dans cette étape, les particules cristallines formées au cours des différentes phases de la lithogénèse vont être retenues dans le rein ou les voies urinaires et vont croître pour former un calcul (9). Les aspérités liées aux arêtes et angles pointus de certains cristaux ou agrégats cristallins contribuent à l'accrochage de ceux-ci dans les tubes à la surface de la papille. Pour de nombreux auteurs (17, 18), la papille constitue un lieu privilégié de rétention et de nucléation lithiasique.

3.6. Croissance du calcul

Le support matriciel, le corps étranger ou l'agrégat accroché à la muqueuse forment le nucléus du calcul qui grossit peu à peu, par capture de nouveaux cristaux sur la structure initialement formée. Les premiers temps de la lithogénèse (cristallisation et rétention) sont courts, n'excédant pas la durée du transit de l'urine dans le rein (environ une minute), alors que la croissance, qui dépend de l'environnement physico-chimique, est plus ou moins lente. Un calcul de 10 mm de diamètre se forme sur une période allant de quelques mois jusqu'à 15 à 20 ans selon le degré ou la pérennité de l'activité cristallogène de l'urine (10).

3.7. Conversion cristalline

La conversion cristalline se déroule parallèlement à la croissance du calcul, ce phénomène se réalise dans la majorité des cas, par un processus de dissolution-recristallisation, une transformation d'une espèce cristalline hydratée en une espèce cristalline de degré d'hydratation inférieur. Une telle conversion est observée principalement avec la weddellite qui se transforme progressivement vers l'étape finale, thermodynamiquement plus stable qui est la whewellite (10, 16).

Ce processus permet de comprendre pourquoi beaucoup de calculs d'infection anciens, conservés dans des musées et analysés aujourd'hui par des techniques physiques modernes comme la spectrométrie infrarouge ou la diffraction des rayons X, révèlent de fortes proportions de newbéryite alors qu'ils étaient initialement composés de struvite (9). La figure 1 résume les différentes étapes de la lithogénèse.

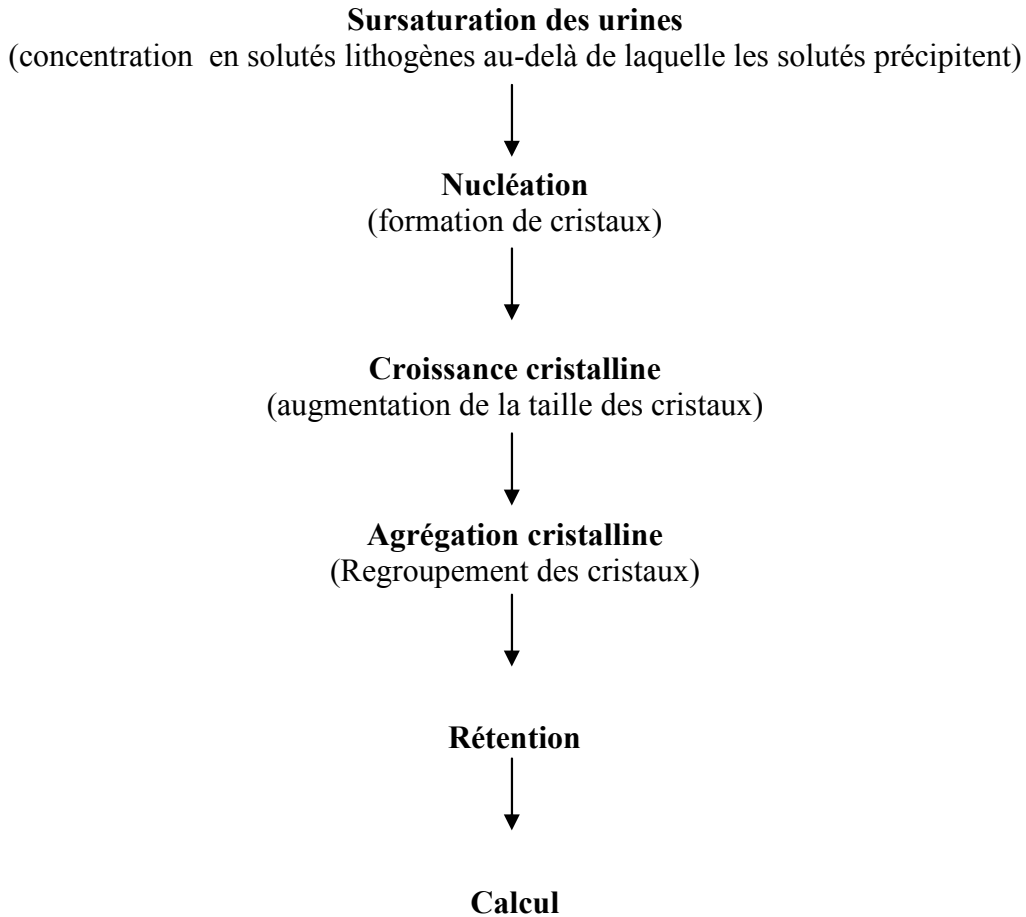


Figure 1 : Les étapes de la lithogénèse.

4. Promoteurs, inducteurs et inhibiteurs urinaires

La formation de cristaux est la conséquence d'un déséquilibre entre promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation. Elle est due soit à un déficit d'inhibiteurs, soit à un excès de promoteurs. Il existe aussi des substances qui contribuent à rompre l'équilibre, ce sont les inducteurs de la cristallisation (16, 19, 20).

On désigne par promoteurs tous constituants susceptibles isolément, ou en association de cristalliser ou de contribuer directement à la formation d'un calcul. Pour s'opposer aux effets des

promoteurs, différentes substances de l'urine vont empêcher les cristaux de grossir ou de s'agréger, ils sont désignés sous le terme d'inhibiteurs de la cristallisation. Ces derniers sont capables de réduire la sursaturation d'une substance donnée par complexation et/ou sur les étapes de la cristallisation par blocage des sites de croissance situés à la surface des cristaux (21), et avoir ainsi un effet sur leur morphologie (22). Daudon et Coll ont remarqué que l'inhibiteur n'agit pas en recouvrant la totalité de la surface du cristal, il suffit de 1% pour stopper la croissance cristalline (11), et chacun a son propre mode d'action, en fonction des phases insolubles en présence.

Les inducteurs jouent un rôle d'initiateur de la nucléation hétérogène ou comme facteurs facilitant la croissance et l'agrégation cristallines, parmi eux se trouvent les protéines où l'activité inductrice est souvent dépendante du pH urinaire pour certaines d'entre elles. Par exemple, Scurr DS et Coll (23) ; ont montré qu'un pH acide facilite la polymérisation de la protéine de Tamm-Horsfall qui perd alors ses propriétés inhibitrices et favorise l'agrégation de cristaux oxalo-calcique en s'opposant au blocage des sites de croissance par les petites molécules telles que les pyrophosphates et les citrates.

5. Influence du pH urinaire sur la lithogénèse

Le pH urinaire (tableau 1), qui traduit l'acidité ou la basicité de l'urine, exerce un rôle déterminant sur l'ionisation de diverses molécules promotrices ou inhibitrices des urines (24). Il a d'une certaine manière un effet inhibiteur indirect, mais important vis à- vis de la nucléation hétérogène de l'oxalate de calcium (16). Le pH urinaire a une influence négligeable sur la précipitation spontanée des cristaux d'oxalate de calcium (24), mais favorise celle de l'acide urique quand il est acide ($< 5,3$). Un pH supérieur à 6 s'accompagne d'une précipitation de phosphate de calcium carbonaté sous forme cristalline (carbapatite) ou amorphe (phosphate amorphe de calcium carbonaté), tandis qu'un pH supérieur à 8 entraîne la précipitation du phosphate ammoniaco-magnésien et de l'urate d'ammonium (tableau 1) (24).

Tableau 1 : Domaine usuel de pH favorisant la précipitation des principales espèces cristallines observées dans les urines (16).

Principales espèces cristallines	Domaine usuel de pH
Acide urique dihydraté	4,7-5,4
Urates amorphes complexes	5,2-5,8
Weddellite	5,3-6,6
Whewellite	5,3-6,8
Brushite	5,7-7,0
Carbapatite et PACC	5,9-7,5
Struvite	6,8-8,2
Urate acide d'ammonium	7,4-8,5

6. Anomalies morpho-anatomiques des voies urinaires

Les anomalies anatomiques de l'appareil urinaire sont multiples, elles s'accompagnent de lithiase dans une proportion variable de cas, suggérant la participation d'autres facteurs, métaboliques ou infectieux (25). L'anomalie anatomique facilite la cristallisation des espèces en sursaturation, la prolifération de bactéries lithogènes ou la rétention de particules cristallines (26). Toute déformation tubulaire, tout étranglement des conduits excréteurs ou obstacles anatomique (rein en fer à cheval, rein ectopique) constituent des facteurs favorisant la rétention des particules solides présentes dans les voies urinaires. Les calculs éventuels vont soit se former, soit rester bloqués au niveau de l'anomalie ou en amont de celle-ci (26).

7. Facteurs nutritionnels

Le régime alimentaire d'un patient influencera grandement sa chimie urinaire et son risque de former des calculs rénaux. La majorité des lithiases, relève d'anomalies métaboliques urinaires induites par des comportements nutritionnels inadaptés. Pour expliquer les variations de la fréquence de la lithiase urinaire, les enquêtes épidémiologiques montrent que l'alimentation est l'un des principaux facteurs de risque de formation de calculs (27).

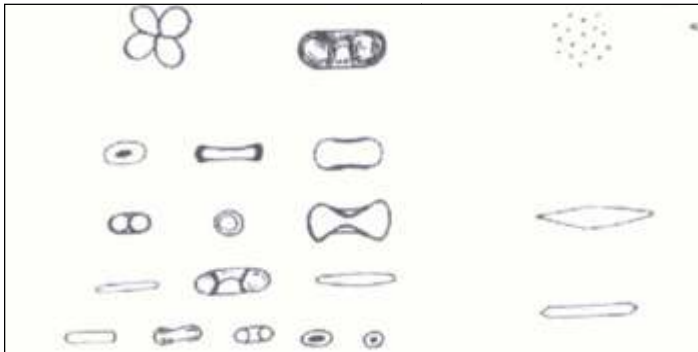
8. Lithiase oxalocalcique

8.1. Phases cristallines de l'oxalate de calcium

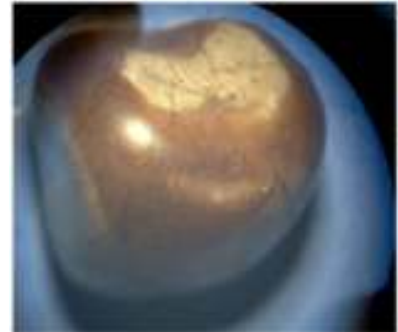
Lorsque la sursaturation est élevée, la phase cristalline formée dépend essentiellement du rapport molaire calcium/oxalate, et donc l'oxalate de calcium peut se cristalliser sous deux formes.

8.1.1. Oxalate de calcium monohydraté

L'oxalate de calcium monohydraté est observé quand le rapport calcium/oxalate est faible, c'est-à-dire inférieur à 5 (28). La whewellite très polarisante à plusieurs faciès, les cristaux sont habituellement de forme ovale avec une dépression centrale et des extrémités renflées qui leur donnent un aspect en haltères ou en sablier ou encore une forme en baguette qui est rare (figure 2).



Cristaux



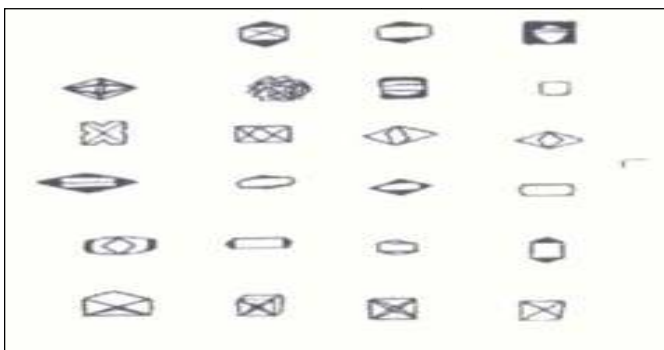
Calcul

Figure 2 : Oxalate de calcium monohydraté (whewellite)

La Whewellite est l'un des constituants des calculs lithiasiques, elle se caractérise par sa taille petite, lisse de couleur vert jaunâtre au brun, dure à fragmenter bien connue chez les urologues (29).

8.1.2. Oxalate de calcium dihydraté

L'oxalate de calcium dihydraté apparaît lorsque le rapport calcium/oxalate est supérieur à 14 (28), sa forme est hexagonale à polarisation intense, losangique à polarisation légère et en aspect enveloppe à polarisation très peu ou pas (figure 3).



Cristaux



Calcul

Figure 3 : Oxalate de calcium dihydraté (weddellite)



La Weddellite diffère de la whewellite dans le nombre de molécules d'eau qui est incluse dans leur structure cristalline, et ceci leur donne des comportements différents. Parfois la Weddellite se déshydrate partiellement pour donner la Whewellite (30, 31).

8.2. Facteurs de risque métaboliques

L'oxalate et le calcium (Tableau 2) sont des facteurs lithogènes, leur présence en excès entraîne une sursaturation urinaire, susceptible d'aboutir à la formation de calculs oxalo-calciques. Dans ce cas, la whewellite est oxalate dépendant, donc un marqueur d'états hyperoxaluriques, alors que la weddellite est plutôt calcium dépendant, observée dans des contextes hypercalciuriques (32, 33), le tableau 3 résume le rôle des habitudes alimentaires dans la lithogène. L'augmentation de la concentration de ces substances résulte soit d'un apport alimentaire ou d'une production d'origine métabolique accrue (34). Les principaux facteurs contribuant à la sursaturation de l'oxalate de calcium sont :

- la dilution insuffisante des urines ;
- l'hypercalciurie ;
- l'hyperoxalurie ;
- l'hypocitraturie.

Tableau 2 : Promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation de l'oxalate de calcium (24).

Promoteurs	calcium	oxalate	
			
Phase insoluble	Oxalate de calcium		
Etapes de la lithogénèse	N	C	Ag
IN de FPM			
Citrate	+++	+	+++
Pyrophosphate	+	+	++
Magnésium	++	+	-
IN Macromoléculaires			
Sulfate de chondroïtine	-	++	++
Sulfate d'héparane	-	+++	++
Protéine de Tamm-Horsfall		+	++

IN : inhibiteurs ; FPM : faible poids moléculaire ; N : nucléation ; C : croissance ; Ag : agrégation.

8.2.1. La dilution insuffisante des urines

C'est le principal facteur de risque de la lithiase calcique, une diurèse trop faible favorise la lithiase, car elle augmente la concentration urinaire de l'oxalate de calcium. Elle est le plus souvent liée à un volume insuffisant de boissons (35) qui conduit à une augmentation de la concentration des solutés lithogènes. Cela aggrave le déséquilibre entre promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation urinaire favorisé par les excès nutritionnels, situation particulièrement fréquente chez les sujets lithiasiques (27). Les apports hydriques doivent être convenablement répartis sur les 24 heures pour éviter la récurrence et augmenter la diurèse quotidienne qui doit être portée à 2 l/j chez les sujets lithiasiques (27, 36, 37).

8.2.2. Hypercalciurie

L'alimentation usuelle apportée à l'être humain est contenue principalement dans le lait et les produits laitiers (10), seule une fraction du calcium ingéré est absorbée et l'autre est éliminée par les urines. Une excrétion urinaire de calcium supérieure à 0,1 mmol/kg de poids/jour ou 4 mg/kg/jour (38-40) conduit à une hypercalciurie, cette dernière est un point clé de la lithiase, elle est l'un des principaux facteurs de risque de formation de calculs calciques, qu'ils soient oxalocalciques ou phosphocalciques ou mixtes.

L'augmentation de la quantité du calcium absorbé par l'intestin, la libération excessive du calcium osseux (41, 42) et le défaut primitif de la réabsorption tubulaire du calcium peuvent provoquer une augmentation de la calciurie (10).

8.2.3. Hyperoxalurie

L'augmentation de l'élimination urinaire de l'oxalate est un facteur de risque, la limite supérieure de l'oxalurie physiologique est de 0,5 mmol/24h pour les deux sexes (38-40). L'oxalate est un acide terminal du métabolisme dont la seule voie d'excrétion est le rein (43). La consommation excessive d'aliments riches en oxalates (chocolat, betteraves, épinards) et les fortes doses de la vitamine C, provoquent une hyperoxalurie modérée comprise entre 0,5 et 0,8 mmol/24h (34). L'état de sursaturation des urines pour l'oxalate de calcium dépend davantage du taux d'oxalate que celui du calcium (44).

8.2.4. Hypocitraturie

Le citrate forme un sel soluble avec le calcium et l'empêche de précipiter, il peut être apporté par certains fruits et légumes, en particulier les agrumes. L'excrétion urinaire du citrate

est essentiellement dépendante de l'équilibre acido-basique intracellulaire. Une acidose aura tendance à augmenter la réabsorption tubulaire du citrate et engendrer une hypocitraturie, ce qui diminuera la complexation du calcium urinaire. La meilleure façon de majorer la citraturie est d'augmenter la consommation quotidienne de légumes et de fruits (27).

8.2.5. Facteurs nutritionnels

Au cours du XXe siècle, il a été établi que la consommation de sel, de protéines animales et de sucres raffinés a progressé en même temps qu'une baisse de la consommation des aliments végétaux riches en fibres et en potassium (45). Selon une étude épidémiologique, Andersen a montré que la progression de la maladie lithiasique constatée dans les pays industrialisés se faisait parallèlement à la consommation de protéines, qui est directement liée au revenu moyen de l'habitant (46).

Il existe une relation entre la natriurèse (quantité de sel dans les urines) et la calciurie. Les apports excessifs de sel induisent une excrétion urinaire importante du sodium et donc une calciurie élevée. Aussi, cette dernière est liée à la consommation de protéines (animales : viande, poisson, volailles, œufs). Plus l'apport protidique est élevé, plus la calciurie l'est également. La consommation de sucres rapides est associée à un risque important de lithiase, les sucres raffinés d'absorption rapide (glucose, saccharose) entraînent une hyperinsulinémie qui provoque à la fois une diminution de la réabsorption tubulaire du phosphore et une augmentation de l'excrétion tubulaire du calcium (27, 43). Le tableau 3 résume le rôle des habitudes alimentaires dans la lithogène.

Tableau 3 : Rôle des habitudes alimentaires dans la lithogène (27).

Habitudes alimentaires	Mécanismes
Effets directs	
Apports élevés de calcium	Hypercalciurie
Apports élevés d'oxalate	Hyperoxalurie
Apports élevés en purines	Hyperuricurie
Apport faible en fibres végétales	Hypercalciurie et Hyperoxalurie
Apport faible en boissons	Augmentation de la concentration des purines
Effets indirects	
Apports élevés de protéines	Hypercalciurie, pH élevé, Hypocitraturie
Apports élevés de lipides	Hyperoxalurie
Apports élevés en sucres raffinés	Hypercalciurie
Apports élevés de sel	Hypercalciurie

8.3. Modèles d'études de la cristallisation de l'oxalate de calcium

La cinétique et la thermodynamique de la formation des cristaux d'oxalate de calcium ont été étudiées de deux façons distinctes.

- L'addition à des solutions sursaturées dans un état métastable (ensemencement) de germes cristallins d'oxalate de calcium afin d'induire la cristallisation (47-49). C'est une méthode délicate où la cinétique de cristallisation dépend, de la forme, de la taille et de l'âge des cristaux.
- Le mélange de deux solutions salines, l'une contenant des ions calcium et l'autre des ions d'oxalate afin d'obtenir une solution sursaturée : le produit molaire des ions calcium et oxalate doit être supérieur au produit de formation des cristaux (50).

L'évolution de la cristallisation est suivie :

- ✓ Par la mesure du potentiel Zêta (mesure de la charge à la surface des cristaux) qui permet de déduire la quantité d'oxalate de calcium formé (50).
- ✓ Par la mesure de la concentration résiduelle en calcium par absorption atomique, après filtration (47, 48).
- ✓ Par la mesure de calcium ionisé par une électrode spécifique combinée à une électrode au calomel (49).
- ✓ Par la mesure de la densité optique par l'analyse turbidimétrique en continu, dans un système évoluant vers l'équilibre (21).

Dans tous les cas, les concentrations testées en calcium et en oxalate varient de 10^{-4} à 10^{-3} M. la cristallisation est étudiée à des températures variant de 15 à 45°C. Dans les études réalisées par Meyer et de Skrtic (47, 49), les urines artificielles ont été préparées avec une solution de NaCl de telle sorte à avoir une force ionique de 0,15 ou 0,30 M. Quant au pH, il est généralement compris entre 6 et 7, cependant toutes les études reconnaissent qu'il n'influence pas la cristallisation de l'oxalate de calcium pour un pH compris entre 5 et 10.

8.4. Modèles d'études des inhibiteurs de la cristallisation de l'oxalate de calcium

Comme toute cristallisation, il y'a la phase nucléation, la phase croissance et la phase agrégation, l'inhibiteur peut intervenir sur n'importe quelle phase. L'inhibition est qualifiée par rapport à un témoin sans inhibiteur, dans les mêmes conditions afin de déterminer un pourcentage d'inhibition.

8.4.1. Modèles d'étude des inhibiteurs en solution aqueuse

Les inhibiteurs ont été étudiés soit en solution aqueuse d'oxalate de calcium, soit en urines diluées.

- L'étude de la nucléation a été réalisée par Gardner et Coll (48); à 25°C et à 37°C. A 100ml d'urine synthétique est ajoutée une quantité déterminée de $CaCl_2$, le pH est maintenu à 5,7. Ensuite ils sont introduits successivement la solution d'oxalate de sodium et 10 ml d'inhibiteur. Le temps d'induction (t_i) défini comme le temps écoulé entre l'addition de l'oxalate et le moment où la croissance est expérimentalement mesurable est déterminé par une méthode optique (turbidité ou microscope optique). Les résultats montrent que pour des concentrations en calcium de 5mmol/l et en oxalate de 0,47mmol/l sans ajout d'inhibiteur, le temps d'induction $t_i = 15$ secondes, alors qu'en présence d'inhibiteur t_i passe à 30 secondes.
- La majorité des auteurs étudie la croissance cristalline en solution métastableensemencée par des germes cristallins préalablement préparés. Le citrate a été testé de cette façon à des concentrations variant de 10^{-2} à 2mmol/l dans une solution métastable de $CaCl_2$ (1 mmol/l) et $Na_2C_2O_4$ (0,2 mmol/l) contenant du $NaCl$ 0,15M (51, 52). L'inhibition observée par Ligabue (51) est de 10% à 10^{-2} mmol/l, de 50% à 0,15 mmol/l et atteint 100% à 2 mmol/l. Tiselius (52) rapporte une inhibition de 40% pour une concentration en citrate de 0,06 mmol/l.
- De la même manière, ces auteurs (51, 52) ont testé également le pyrophosphate, ils ont trouvé pour la même solution métastable que précédemment, les résultats suivants : à 10^{-5} mmol/l, aucune inhibition, à 10^{-3} mmol/l, environ 50% d'inhibition et à 10^{-1} mmol/l, 100% d'inhibition. Leurs résultats ont été corrélés par ceux obtenus par Will (53).
- Hess et Coll (54); proposent une méthode spectrophotométrique pour évaluer l'importance de l'agrégation cristalline. Ces auteurs utilisent une solution saturée par des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté et évaluent toutes les 2 secondes, la taille des agrégats formés par la mesure de la turbidité à 620 nm, l'induction de l'agrégation étant réalisée à l'aide d'une agitation magnétique. En utilisant cette méthode, ils n'observent aucun effet du citrate sur l'agrégation cristalline de l'oxalate de calcium, même pour une

concentration de 1 mmol/l. Le taux d'inhibition de la protéine Tamm-Hosfall Protein (THP), lorsqu'elle est testée à une concentration de 10^{-4} mmol/l est de 90%. L'augmentation de la force ionique de 0,1M à 0,28M réduit de façon significative l'inhibition induite par la THP à une concentration de $0,5 \times 10^{-4}$ mmol/l, à l'exception de cette concentration, il n'a été observé aucun effet inhibiteur de la THP.

8.4.2. Autres modèles d'étude des inhibiteurs

Deux autres types de modèles ont été utilisés pour étudier la cristallisation de l'oxalate de calcium : les modèles en flux continu et en gel.

- Le modèle en flux continu, exige un bûcher à double paroi, thermostaté à 37°C où sont introduits respectivement, la solution de $CaCl_2$ puis la solution de $Na_2C_2O_4$, le mélange se fait sous agitation à flux constant. Dans l'étude de Robertson WC et Coll (55); les concentrations de l'urine artificielle en calcium et oxalate sont respectivement de 6 et 0,6 mmol/l, le pH de 5,8 et la force ionique de 0,33 M. une inhibition de 50% est observée pour des concentrations égales à 2 mmol/l pour le citrate et 30 mmol/l pour le Magnésium.
- Le modèle en gel, exige une solution de $CaCl_2$ et une autre solution de $Na_2C_2O_4$ qui sont ajoutées à une solution d'agar-agar, de telle façon à atteindre une sursaturation favorable à l'apparition de germes cristallins. La cinétique de la croissance cristalline en fonction du temps est suivie à l'aide d'un microscope couplé à un photomètre et relié à un microprocesseur. Archilles et Coll (56) ont observé pour une concentration en citrate de 0,01 à 5 mmol/l, une inhibition de 3 à 50%.

8.5. Turbidimétrie

La turbidimétrie est une méthode optique qui mesure le trouble (absorbance) qui existe dans une solution. Il s'agit de la mesure de la densité lumineuse I reçue par une cellule photoélectrique par le passage d'un rayon lumineux monochromatique I_0 à travers une cuve d'épaisseur 1 cm, contenant le milieu à étudier (57).

La valeur de l'absorbance A est déterminée par rapport à une valeur référence et s'exprime par :

$$A = \log \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (1)$$

I : intensité lumineuse transmise à la cellule réceptrice ;

I_0 : intensité lumineuse du rayon incident.

L'absorbance (A) est tracée en fonction du temps et le pouvoir inhibiteur est exprimé en % par rapport à un témoin, sa formule (57) est donné comme suit :

$$\%I = \left[1 - \left(\frac{p_{AI}}{p_{SI}}\right)\right] \times 100 \quad (2)$$

Où p_{AI} et p_{SI} représentent respectivement les valeurs des pentes turbidimétriques avec et sans inhibiteurs.

9. Phytothérapie

La phytothérapie est une des thérapies non conventionnelles des plus anciennes, elle remonte dès la naissance de l'humanité. Pendant longtemps, les biologistes, les phytochimistes et les pharmaciens ont été intéressés par l'étude de la composition en principes actifs des plantes.

La phytothérapie ainsi que l'aromathérapie ont perdu de leur intérêt depuis l'émergence de la médecine basée sur la preuve et donc l'usage des médicaments chimiques a pris son essor. Depuis le début des années 2000, il y'a eu la prise de conscience par les patients de plus en plus défavorables aux médicaments de synthèse suite à l'apparition des effets secondaires. Leur efficacité parfois insuffisante ou nulle a renvoyé de nouveau vers l'usage de produits naturels à base de plantes médicinales qui semble avoir beaucoup d'avantages. Ainsi, un grand nombre d'espèces végétales décrit dans les pharmacopées a fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques pour leur effet anti lithiasique. Aujourd'hui, la phytothérapie médicale creuse son chemin, se développe et se codifie. La démarche clinique pratiquée par les professionnels de la santé spécifiquement formés est rigoureuse et l'utilisation des plantes est plus règlementée selon des critères scientifiques.

Dans ce même contexte, on a étudié l'effet inhibiteur *Nigella sativa* et quelques substances naturelles, sur la cristallisation oxalocalcique en fonction du temps et cherché une possibilité de conversion des cristaux de whewellite en wheddellite. Pour cela, on a utilisé une urine artificielle saturée en oxalate de calcium et varié la concentration de la plante et des substances naturelles.

Références bibliographiques

1. Daudon M, Traxer O, Lechevallier E, Saussine C. Épidémiologie des lithiases urinaires. *Progrès en urologie*. 2008;18(12):802-14.
2. Prien E, Prien Jr E. Composition and Structure of Urinary Stone. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 1969;11(11):597.
3. Robertson WG, Peacock M, Marshall RW, Marshall DH, Nordin BC. Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. *New England Journal of Medicine*. 1976;294(5):249-52.
4. Weber DV, Coe FL, Parks JH, Dunn MSL, Tembe V. Urinary saturation measurements in calcium nephrolithiasis. *Annals of internal medicine*. 1979;90(2):180-4.
5. Azoury R, Goldwasser B, Wax Y, Perlberg S, Garti N, Sarig S. Evaluation of the relative inhibitory potential of fractionated urinary macromolecules. *Urological research*. 1985;13(4):199-205.
6. Dent C, Sutor D. Presence or absence of inhibitor of calcium-oxalate crystal growth in urine of normals and of stone-formers. *The Lancet*. 1971;298(7728):775-8.
7. Edyvane KA, Hibberd CM, Harnett RM, Marshall VR, Ryall RL. Macromolecules inhibit calcium oxalate crystal growth and aggregation in whole human urine. *Clinica chimica acta*. 1987;167(3):329-38.
8. Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney International*. 1978;13(5):361-71.
9. Daudon M, Traxer O, Lechevallier E, Saussine C. La lithogénèse. *Progrès en urologie*. 2008;18(12):815-27.
10. Jungers P, Daudon M, Le Duc A. Épidémiologie de la lithiase urinaire. *Lithiase urinaire Paris: Flammarion médecine-sciences*. 1989:1-34.
11. Daudon M, Hennequin C, Bader C, Jungers P, Lacour B, Drueke T. Inhibiteurs de cristallisation dans l'urine. *Actualités néphrologiques Jean Hamburger*. 1994:165-220.
12. Achraf MC. Les urétérolithotomies laparoscopique. Thèse 2016.
13. Berland Y. La lithiase urinaire oxalo-calcique idiopathique: Nouvelles approches physiopathologiques. *Néphrologie*. 1999;20(7):363-9.

14. Atmani F, Opalko F, Khan S. Cellular membranes present in the whole human urine promote heterogeneous nucleation of calcium oxalate crystals. *Renal Stone Disease Crystallization process, pathophysiology, metabolic disorders and prevention* Paris, Elsevier. 1997;143-4.
15. Abdelmalek FT. High efficiency hybrid car with gasoline engine, and electric battery powered motor. Google Patents; 1994.
16. Daudon M, Cohen-Solal F, Jungers P. Mécanismes de la lithogénèse et de la cristallurie. *Biologie & Santé*. 2000;1(1):51-3.
17. Mandel NS, Mandel GS. Physicochemistry of urinary stone formation. *Renal Stone Disease*: Springer; 1987. p. 1-24.
18. Pak CY, Arnold LH. Heterogeneous nucleation of calcium oxalate by seeds of monosodium urate. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. 1975;149(4):930-2.
19. Hennequin C, Lacour B, Daudon M. Les inhibiteurs de cristallisation. *L'Eurobiologiste*. 1993;27(203):47-55.
20. Kato Y, Yamaguchi S, Yachiku S, Nakazono S, Hori J-i, Wada N, et al. Changes in urinary parameters after oral administration of potassium-sodium citrate and magnesium oxide to prevent urolithiasis. *Urology*. 2004;63(1):7-11.
21. Kohri K, Garside J, Blacklock N. The role of magnesium in calcium oxalate urolithiasis. *British journal of urology*. 1988;61(2):107-15.
22. Werness PG, Bergert JH, Smith LH. Crystalluria. *Journal of Crystal Growth*. 1981;53(1):166-81.
23. Scurr D, Robertson W. Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. III. Studies on the role of Tamm-Horsfall mucoprotein and of ionic strength. *The Journal of urology*. 1986;136(2):505-7.
24. Zerifi R, Bahlous A, Marakchi O, Daudon M, Bartagi Z, Abdelmoula J, editors. *Syndrome métabolique: physiopathologie et impact sur la lithogénèse*. *Annales de Biologie Clinique*; 2008.
25. Daudon M, Bader C, Jungers P. Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microscopy*. 1993;7(3):1081-106.

26. Daudon M, COHEN-SOLAL F, Lacour B, Jungers P. Lithiases et anomalies des voies urinaires: la composition des calculs est-elle indépendante de l'anomalie anatomique. *Prog Urol*. 2003;13:1320.
27. Daudon M. Epidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France.[Epidemiology of nephrolithiasis in France]. *Ann Urol(Paris)*. 2005:209-31.
28. Daudon M, Valognes A, Hennequin C, Jungers P. Importances de l'analyse morpho-constitutionnelle des calculs et des cristaux urinaires pour le diagnostic étiologique et le suivi thérapeutique de la maladie lithiasique. *Spectra biologie*. 1992(5):33-51.
29. Daudon M. Les lithiases urinaires secondaires à des maladies héréditaires. *Biologie et Santé* 2001; 1: 141. 2001;156.
30. Leusmann D. Whewellite, weddellite and company: where do all the strange names originate? *BJU international*. 2000;86(4):411-3.
31. Morris AG, Rodgers AL. A probable case of prehistoric kidney stone disease from the northern Cape Province, South Africa. *American journal of physical anthropology*. 1989;79(4):521-7.
32. Daudon M, Jungers P. Clinical value of crystalluria and quantitative morphoconstitutional analysis of urinary calculi. *Nephron Physiology*. 2004;98(2):p31-p6.
33. Daudon M, Réveillaud R. Whewellite et weddellite: vers des étiopathogénies différentes: intérêt dy typage morphologique des calculs. *Nephrologie*. 1984;5(5):195-201.
34. Blaque-Belair A. Dictionnaire médical clinique, pharmacologique et thérapeutique 1981.
35. Siener R, Hesse A. Fluid intake and epidemiology of urolithiasis. *European journal of clinical nutrition*. 2003;57(S2):S47.
36. Borghi L, Meschi T, Amato F, Briganti A, Novarini A, Giannini A. Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized prospective study. *The Journal of urology*. 1996;155(3):839-43.
37. Hennequin C, Daudon M, Phung T, Lacour B, Jungers P. Evaluation du risque lithogène dans la lithiase rénale: intérêt de la mesure de la densité urinaire. *La Presse Médicale*. 1995;24(33):1559-62.
38. Jungers P, Daudon M. Démarche diagnostique devant une lithiase rénale. *Médecine thérapeutique*. 2000;5(10):785-90.
39. Zerwekh JE. Nutrition and renal stone disease in space. *Nutrition*. 2002;18(10):857-63.

40. Frey J, Daudon M, Raby N, Augereau C, Dechaux M, Diehl J-L, et al., editors. Valeur sémiologique des paramètres biochimiques urinaires. *Annales de Biologie Clinique*; 2001.
41. Pak CY, Kaplan R, Bone H, Townsend J, Waters O. A simple test for the diagnosis of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *New England Journal of Medicine*. 1975;292(10):497-500.
42. Peacock M, Nordin B. Tubular reabsorption of calcium in normal and hypercalciuric subjects. *Journal of clinical pathology*. 1968;21(3):353-8.
43. Traxer O, Lechevallier E, Saussine C. Diététique et lithiase rénale. Le rôle de l'urologue. *Progrès en urologie*. 2008;18(12):857-62.
44. Audran M, Legrand E. L'hypercalciurie. *Revue du rhumatisme*. 2000;67(10):887-93.
45. Dupin H, Leynaud-Rouaud C. Evolution de la consommation des divers aliments en France au cours des dernières décennies: Comparaison avec d'autres pays. Dupain H, Cuq J-L, Malewiak M-L et coll *Alimentation et nutrition humaines ESF*, Paris. 1992;1533:51-65.
46. Andersen D, editor *Historical and geographical differences in the pattern of incidence of urinary stones considered in relation to possible aetiological factors. Renal stone research symposium*; 1969: Churchill London.
47. Meyer J, Smith L. Growth of calcium oxalate crystals. II. Inhibition by natural urinary crystal growth inhibitors. *Investigative urology*. 1975;13(1):36-9.
48. Gardner G. Nucleation and crystal growth of calcium oxalate trihydrate. *Journal of Crystal Growth*. 1975;30(2):158-68.
49. Skrtic D, Markovic M, Komunjer L, Füredi-Milhofer H. Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions. I. Kinetics of spontaneous precipitation of calcium oxalate trihydrate. *Journal of crystal growth*. 1984;66:431-40.
50. Doremus R, Gardner G, McKay W, editors. *Crystallization of calcium oxalate in various media and urolithiasis. International colloquium on renal stones University of Florida Press, Gainesville*; 1976.
51. Ligabue A, Fini M, Robertson W. Influence of urine on "in vitro" crystallization rate of calcium oxalate: Determination of inhibitory activity by a [¹⁴C] oxalate technique. *Clinica Chimica Acta*. 1979;98(1-2):39-46.
52. Tiselius HG. The effect of pH on the urinary inhibition of calcium oxalate crystal growth. *British journal of urology*. 1981;53(5):470-4.

53. Will EJ, Bijvoet OL, te Brake-van der Linden H. Inhibition of calcium oxalate crystal growth-a simple method of measurement and preliminary results. *Urolithiasis Research*: Springer; 1976. p. 367-70.
54. Hess B, Nakagawa Y, Coe FL. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1989;257(1):F99-F106.
55. Robertson W, Scurr D. Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. I. Studies with a continuous crystallizer using an artificial urine. *The Journal of urology*. 1986;135(6):1322-6.
56. Achilles W. Microphotometric quantification of crystal growth in gels for the study of calcium oxalate urolithiasis. *Scanning microscopy*. 1991;5(4):1001-17.
57. Hennequin C, Lalanne V, Daudon M, Lacour B, Druke T. A new approach to studying inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *Urological research*. 1993;21(2):101-8.

Chapitre II

Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Chapitre II

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

1. Introduction

La lithiase urinaire est une pathologie en nette progression dans les pays industrialisés (1-4). Le constituant majoritaire des calculs est l'oxalate de calcium, il représente plus de 70% des cas (5-10). On le retrouve en deux phases cristallines majeures: l'oxalate de calcium monohydraté et l'oxalate de calcium dihydraté. La sursaturation est un des facteurs les plus importants dans le processus lithogènes, elle est générée par un excès de solutés cristallisables que sont l'oxalate et le calcium (8, 11-18). Leur précipitation dans les urines se fait sous forme de dépôt de cristaux, mais leur action peut être contre balancée par des substances naturelles appelées inhibiteurs. Les plantes médicinales sont d'une aide thérapeutique importante pour diverses affections. Des travaux ont été consacrés à l'étude de l'effet des plantes sur la cristallisation oxalocalcique, tels que *Herniaria hirsuta* et *Phyllanthus niruri* faites par Khan (19) et Freitas et al (20). La *Nigella sativa* Linnaeus a fait aussi l'objet de plusieurs recherches, c'est une plante comestible, cultivée en Europe, en Afrique du Nord et en Asie (21).

Dans le présent travail, *Nigella sativa* Linnaeus a été choisie dans le but de tester son potentiel inhibiteur sur la cristallisation (nucléation, croissance et agrégation) de l'oxalate de calcium et ainsi évaluer son efficacité sur la prévention de la formation des calculs urinaires, qui représente un problème important de santé publique. Pour cela, on a mis au point un modèle de cristallisation d'oxalate de calcium *in vitro*, permettant d'évaluer l'effet inhibiteur de la plante en extrait aqueux dans les urines artificielles et préciser les conditions de la cristallisation de l'oxalate de calcium. En même temps, la recherche d'une conversion cristalline a été un des objets de notre étude. L'étude morphologique et le suivi de la cristallisation en taille des cristaux ont été réalisés.

2. Matériels et méthodes

2.1. Plante

Nom botanique : *Nigella sativa*.

Nom arabe : sanouj, habbat al sawda et habbat el baraka (22, 23).

Famille : renonculacées.



Figure 4 : Fleurs et graines de *Nigella sativa*

2.1.1. Caractéristiques botaniques

La *Nigella* est une plante herbacée, annuelle de 60cm de haut, ses feuilles sont très découpées, ses fleurs sont de couleur bleue (figure 4) et ses graines aromatiques sont d'un noir intense (figure 4) (24).

2.1.2. Principaux composants

Les composants principaux de cette plante ont été identifiés, on y retrouve entre autres le *p*-cymene, le 4-terpineol, le thymohydroquinone, le thymoquinone, le carvacrol, le carvone, le thymol, les acides aminés, les hydrates de carbone, les protéines, les acides gras insaturés, les alcaloïdes et des sels minéraux tels que le Phosphore, potassium, calcium et fer (20, 25, 26).

2.1.3. Utilisation

La graine de *Nigella sativa* est diurétique, stimulante, carminative et insectifuge. Elle peut être utilisée comme un antiinflammatoire (21, 27), un antioxydant (23, 28), un antibactérien (29, 30) ou un anticancéreux (31, 32).

2.2. Préparation de *Nigella sativa*

Dans notre étude, la cueillette des échantillons de *Nigella sativa* a été au mois d'Avril 2012 dans l'Ouest algérien, au village de Béni Zeroual à douze kilomètres de Mostaganem, une

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

ville côtière située à trois-cent-soixante-trois kilomètres de l'ouest d'Alger. . On a utilisé la plante en graines fraîches de taille 2mm de longueur et 1 mm de largeur. Après avoir identifié l'espèce *Nigella sativa* L, les graines fraîchement récoltées, ont été lavées et laissées sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré afin de procéder à l'infusion.

La formule d'extraction aqueuse consiste à verser 100ml d'eau distillée bouillante sur une concentration de 2g (33) de la *Nigella*. Le temps de repos de la plante dans l'eau est de 15 minutes (34), la solution est ensuite filtrée. L'extrait de *Nigella sativa linnaeus* a été préparé à différentes concentrations volumiques : 4% (v/v), 5% (v/v), 6% (v/v), 10% (v/v), 20% (v/v), 50% (v/v), 80% (v/v) et 100% (v/v).

2.3. Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence et en présence de *Nigella sativa*

2.3.1. Cristallisation en absence de *Nigella sativa*

La cristallisation oxalocalcique en absence d'inhibiteur, est un mélange de solutions aqueuses de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) et de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (Merck), le tout préparée à partir d'une solution de NaCl pour maintenir la force ionique constante de 0,15M. Le modèle *in-vitro* entrepris présente beaucoup d'avantages comme la bonne reproductibilité, la possibilité de suivre les tailles des cristaux en continu sur les différentes étapes de la cristallisation et enfin la récupération des filtrats. En effet, sous agitation magnétique constante de 500 tours/min, un mélange de volume égal a été réalisé à partir des deux solutions $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ramenées à une température de 37°C pour rester proches des conditions biologiques. Le volume final de la solution a été de 300ml et les concentrations finales respectives en calcium et en oxalate au sein du mélange ont été de 4mM et 1mM (35).

2.3.2. Cristallisation en présence de *Nigella sativa*

On a appliqué le modèle oxalocalcique *in-vitro* (figure 5) avec le même protocole opératoire pour étudier l'effet de l'extrait de *Nigella sativa* sur notre urine artificielle. À $t=0s$, les solutions ont été mélangées simultanément pour un volume total de 300ml. Les expériences ont été répétées plus de 3 fois, le nombre d'essais permet d'estimer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (cv).



Figure 5 : Modèle de cristallisation oxalocalcique *in-vitro*

2.4. Etude morphologique

Les solutions de la cristallisation en absence et en présence de *Nigella sativa* une fois mélangées, des prélèvements ont été effectués à différents temps et observés sous microscope optique à lumière polarisée de modèle ICS standard 25 Zeiss, équipé d'oculaires permettant un grossissement 40 x 10. L'analyse consiste à identifier les cristaux d'oxalate de calcium formés, à mesurer leur taille moyenne (T_{moy}) et à prendre des photographies à l'aide d'un appareil photo numérique type SONY T70. Les mesures des tailles ont été faites en micromètre. Tout au long de la cinétique, on a suivie le changement du pH des solutions en le mesurant à l'aide d'un microprocesseur pH-mètre (HANNA). La durée de la cristallisation a été de 1200 secondes.

Les tailles des cristaux mesurées permettent de calculer le taux d'inhibition (**I%**) et sa formule est la suivante (17) :

$$I\% = \left(1 - \frac{T_A}{T_S}\right) \times 100 \quad (3)$$

T_A : Taille des cristaux en présence de *Nigella sativa* à l'instant t;

T_S : Taille des cristaux en absence de *Nigella sativa* à l'instant t.

2.5. Allure de la courbe et critères régissant l'expérimentation

La courbe obtenue exprimant l'évolution de la taille des cristaux en fonction du temps ressemble à celle de la turbidimétrie et possède l'allure générale représentée sur la figure 6.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

La courbe peut être divisée en trois parties :

1. La première partie correspond à la phase de nucléation. Le paramètre cinétique qui la caractérise est le temps d'induction t_i correspondant au temps écoulé entre la fin de l'addition des solutions et le début de la croissance de la pente.
2. La seconde partie représente la croissance cristalline caractérisée par un deuxième paramètre cinétique qui est la pente. Elle correspond à la partie linéaire de la courbe comprise dans un intervalle de temps variable suivant les conditions opératoires.
3. La troisième partie traduit l'agrégation cristalline qui présente un intérêt important dans

l'étude de la cristallisation.

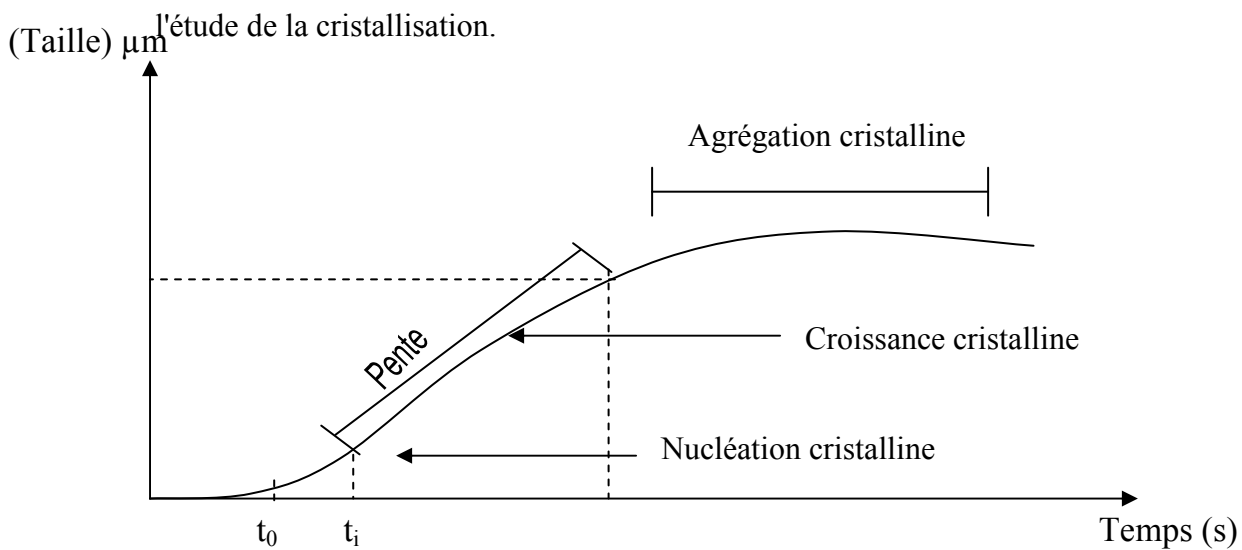


Figure 6 : Allure générale de la courbe de cristallisation oxalocalcique

2.6. Mesure de quantité de calcium et d'oxalate

2.6.1. Mesure de l'oxalate

Le taux d'oxalate libéré par *Nigella* aux concentrations étudiées a été déterminé par la méthode enzymatique colorimétrique, en utilisant les kits de diagnostic (SOBIODA SAS, REF: 1310.001, France) selon la méthode de Lartillot et Vogel (36). Le protocole de travail est décrit ci-dessous :

- **Principe**

L'acide oxalique en présence de l'oxalate oxydase est transformé en peroxyde d'hydrogène, qui produit un composé de couleur bleue. Les réactifs utilisés pour cette mesure

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

sont :

Réactif 1 Tampon pH 3.80; 3-(Diméthylamino) acide Benzoïque, conservateur et stabilisant.

Réactif 2 Tampon succinique pH 3.80; conservateurs et stabilisateurs.

Réactif 3 Oxalate oxydase, peroxydase, conservateurs et stabilisants.

Standard Oxalate 0.5 mM, conservateurs et stabilisants.

- **Mode de travail**

1. Mélanger 1 ml d'urine avec 1 ml de diluant échantillon.
2. Contrôler le pH si nécessaire, ajuster le pH entre 5.0 et 7.0 avec HCl 1N ou NaOH 1N.
3. Vider le mélange dans un tube de purification.
4. Agiter vigoureusement pendant 5 minutes, soit manuellement par inversion et continuellement, soit grâce à un agitateur rotatif. Centrifuger ou filtrer.

- **Méthode de dosage**

Réactifs	Blanc	Standard	Échantillon
Réactif 1	500 µl	500 µl	500 µl
Réactif 2	500 µl	500 µl	500 µl
Eau distillée	50 µl	-	-
Standard	-	50 µl	-
Échantillon	-	-	50 µl
Réactif 3	100 µl	100 µl	100 µl

Ajouter en dernier le **Réactif 3**; bien mélanger et laisser incuber pendant 10 minutes. Faire le zéro avec le blanc réactif et lire les absorbances.

- **Calcul de la teneur en acide oxalique**

$$\text{Acide oxalique} = (A \text{ échantillon} / A \text{ standard}) \times 0.5 \times 2 \times L \text{ d'urine} \quad (4)$$

Les teneurs en Acide oxalique sont exprimées en mg/24 h.

2.6.2. Mesure du calcium

On a mesuré le calcium libéré par *Nigella sativa* à différentes concentrations grâce à une électrode spécifique de calcium de type Orion modèle 97-20. Elle est composée de deux parties : la partie sensible, la membrane spécifique de Ca^{2+} et la partie électrode combinée.

Les électrodes spécifiques possèdent un élément de mesure capable de détecter de manière sélective un ion précis dans un mélange d'ions. Elles disposent d'une méthode

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

analytique simple et souvent sensible. Elles sont peu coûteuses et faciles à la manipulation. L'utilisation des électrodes spécifiques nécessite un étalonnage (37, 38).

Pour l'étalonnage et l'analyse des échantillons, les conditions suivantes ont été fixées :

- utilisation d'erlenmeyers identiques;
- hauteur d'immersion constante pour les électrodes ;
- mesure à température constante de 37°C dans un bain thermostaté.

La reproductibilité a été établie avec la même procédure opératoire, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu.

Lorsque l'électrode est mise en contact avec une solution contenant le calcium, il se développe une différence de potentiel donnée par l'équation de NERST (38, 39):

$$E = E^0 + \frac{2,3RT}{zF} \log \gamma C_i \quad (5)$$

E : potentiel (mV);

E⁰: potentiel standard (mV);

R : coefficient 0,082 atml/mol K ;

T : température (K) ;

F : nombre de Faraday 96000 F ;

Z : nombre d'électrons ;

C_i : concentration de Ca²⁺ ;

γ: coefficient d'activité.

L'équation ci-dessus montre une linéarité entre le potentiel E et log C_i. Le graphe représentant le potentiel en fonction de la concentration, appelée droite d'étalonnage, permet de déterminer la concentration inconnue en calcium de la solution étudiée à partir de la mesure de son potentiel faite par l'électrode spécifique (figure 7).



Figure 7 : Electrode spécifique de calcium

2.7. Analyse infrarouge à transformée de Fourier

Pour un bon suivi, de l'effet de *Nigella sativa* dans notre modèle de cristallisation d'oxalate de calcium, on a utilisé la méthode spectrale IRTF. Les solutions oxalocalcique du mélange de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4mM) et $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1mM) obtenues en absence et en présence de l'extrait ont été filtrées et les précipités récupérés ont été séchés à température ambiante. Les échantillons ont été broyés dans du bromure de potassium pur et sec pour spectroscopie (40). Le mélange, finement pulvérisé, a été transformé en une fine pastille transparente à l'aide d'une presse spéciale sous une pression de 10 tonnes/cm². Les pastilles ont ensuite été analysées sur un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier Hyper IR Shumadzu (figure 8). Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur l'intervalle de longueurs d'onde compris entre 4000-400 cm⁻¹. Les spectres ont été identifiés par comparaison avec des spectres de référence (40-42).

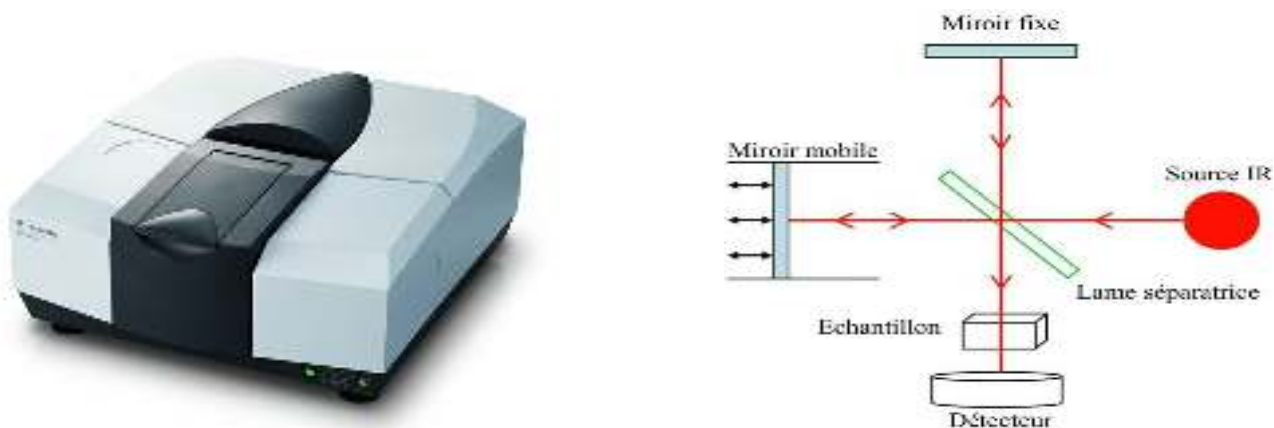


Figure 8 : Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.

Au sein d'un spectromètre IRTF (figure 8), une lame séparatrice semi-transparente divise le faisceau issu de la source en deux faisceaux, l'un réfléchi vers un miroir fixe, l'autre transmet vers un miroir mobile. Le miroir mobile, perpendiculaire au miroir fixe, se déplace à une vitesse constante le long de son axe, plus la distance de déplacement du miroir mobile est grande, plus la précision de la mesure est élevée. Enfin les données sont collectées par un détecteur (43).

2.8. Observation au Microscope à Balayage Electronique

Le microscope à balayage électronique se révèle être un puissant outil de caractérisation texturale et chimique locale de matériaux massifs (44-47). Basé sur l'interaction électron – matière, le terme “électronique ” témoigne de l'utilisation d'électrons comme particule sonde et

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

celui de "balayage" rappelle que c'est au cours du déplacement du faisceau d'électrons sur la surface de l'échantillon que se construit l'image de la surface de l'échantillon sur l'écran de visualisation (43). Pour notre analyse, la source d'électrons est un filament de tungstène. La tension d'accélération a été fixée à 15 kV et la distance de travail, à une valeur de 18,3 mm. On fait varier la pression dans la chambre d'analyse en introduisant de la vapeur d'eau. Des coupes ont été pratiquées au niveau du bulbe pour prélever des échantillons avec une épaisseur de 1 à 2 mm.

Pour confirmer la conversion des cristaux obtenus des filtrats de nos échantillons de la cristallisation oxalocalcique, on a utilisé les observations faites par microscope à balayage électronique de type JEOL (figure 9). Les résultats obtenus correspondent aux échantillons de l'urine artificielle sans et avec l'extrait aqueux de *Nigella sativa*, de concentrations 5% (v/v), 80% (v/v) et 100% (v/v).

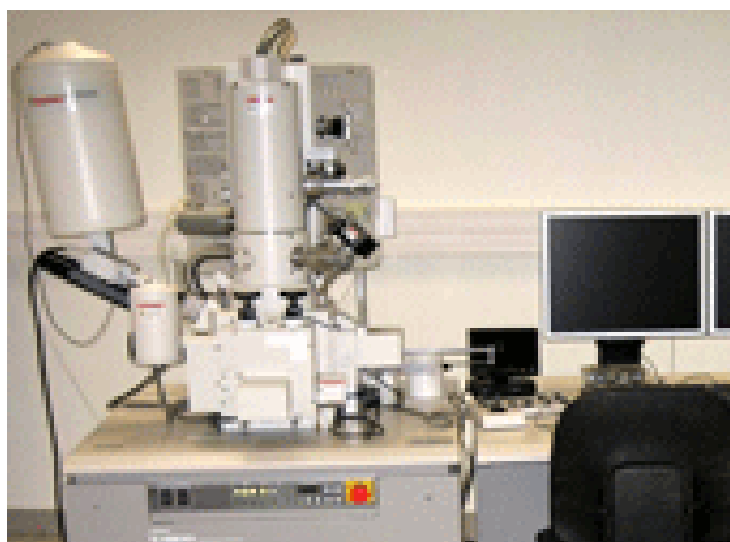


Figure 9 : Microscope à balayage électronique

3. Résultats

3.1. Cristallisation en absence *Nigella sativa*

3.1.1. Analyse par microscope optique

L'évolution de la cristallisation oxalocalcique a été faite par microscope optique à lumière polarisée, cela nous a permis de distinguer les types et les faciès des cristaux d'oxalate de calcium et de mesurer leur taille en micromètre ainsi que celle des agrégats. Le cv reste inférieur à 10% et le tableau 4 illustre les résultats d'une cristallisation sans inhibiteurs durant un temps de 1200s.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Tableau 4 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium pendant 1200s de cristallisation sans d'inhibiteur.

Temps (s)	5	7	12	60	120	300	600	900	1200
SI Cr (µm)	1,25	1,875	3,335	8,886	10	10,55	10,975	10,836	10,836
Ag (µm)	0	0	12,5	22,225	25,411	29,725	29,725	29,725	29,725
T _{Moy} (µm)	0,625	0,937	7,917	15,555	17,705	20,137	20,35	20,28	20,28

SI : sans inhibiteur; T_{Moy} : taille moyenne ; Cr : taille des cristaux, Ag : taille des agrégats

Les formes d'oxalate de calcium (CaC_2O_4) se distinguent les unes des autres par leur système de cristallisation, responsable de la morphologie cristalline différente (48). On distingue trois formes cristallines connues :

- oxalate de calcium monohydraté (whewellite);
- oxalate de calcium dihydraté (weddelite);
- oxalate de calcium trihydraté.

La caractérisation par microscopie optique à lumière polarisée du précipité de notre urine artificielle en absence de *Nigella sativa*, a fait ressortir la seule forme cristalline d'oxalate de calcium qui est la whewellite. Les cristaux se sont formés instantanément et la taille maximum obtenue est d'environ 20,28µm. La taille moyenne des cristaux ne dépasse pas 10,836 µm et celle des agrégats 29,725 µm (tableau 4), ces derniers sont apparus après 12 secondes.

La représentation des tailles moyennes des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté en fonction du temps a donné une courbe illustrée sur la figure 10.

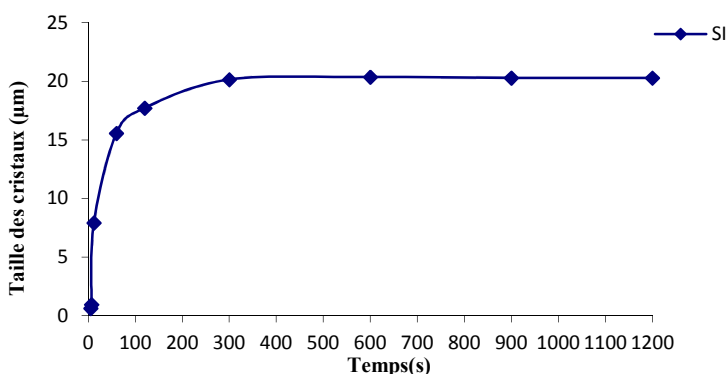


Figure 10 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium monhydraté en fonction du temps et en absence d'inhibiteur.

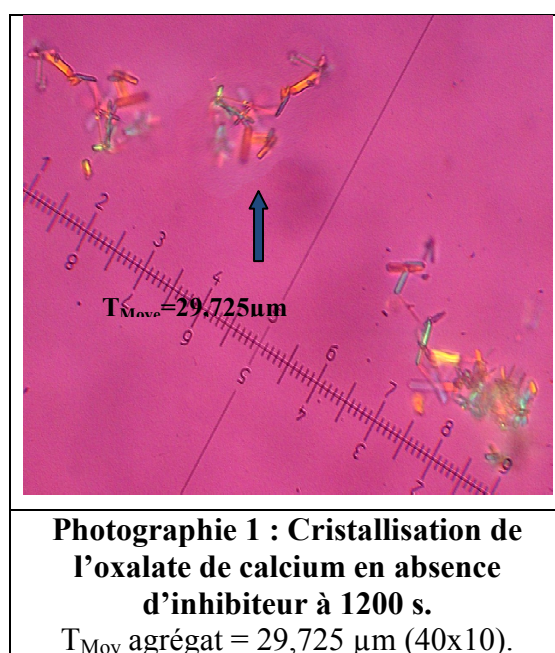
Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

De ce modèle de cristallisation *in vitro*, on a obtenu une courbe (figure 10) représentative des tailles moyenne des cristaux en fonction du temps sur les phases de cristallisation germination, croissance et agrégation. La courbe obtenue ressemble à celle représentée sur figure 6.

3.1.2. Etude morphologique

La photographie ci-dessous représente des cristaux d'oxalate de calcium observés par microscope à polarisation pour une cristallisation sans inhibiteur au temps 1200 secondes.

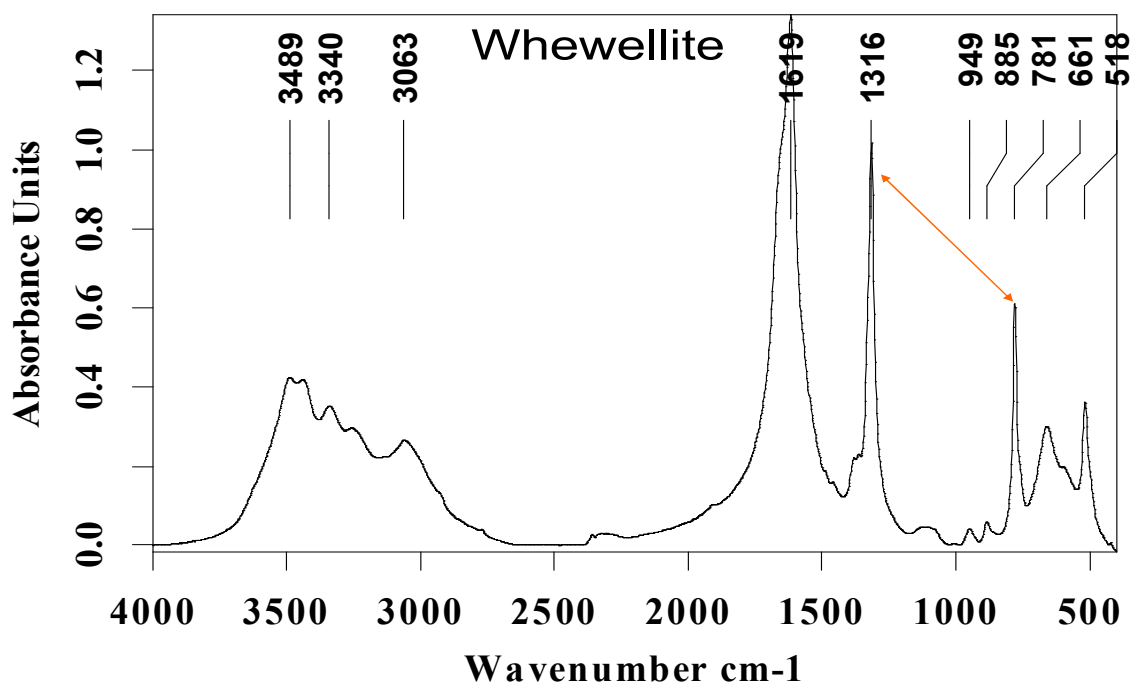


Sur la photographie 1 apparaissent des cristaux de forme allongée, hexagonale, rectangulaire à polarisation intense qui représentent les oxalates de calcium monohydraté. Leur identification a été effectuée par une analyse morphologique en les comparant à ceux des planches d'identification données par Daudon (48).

3.1.3. Analyse infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse spectrale du précipité récupéré à la fin de la cristallisation en absence d'inhibiteur et le spectre IRTF de référence de l'oxalate de calcium monohydraté sont représentés sur les spectres 2 et 1 respectivement.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de Nigella sativa



Spectre 1 : Spectre infrarouge de référence de l'oxalate de calcium monohydraté

Les données spectroscopiques IRTF de whewellite sont données dans le tableau 5.

Tableau 5: Principales fréquences de vibrations de la whewellite (spectre de référence 1).

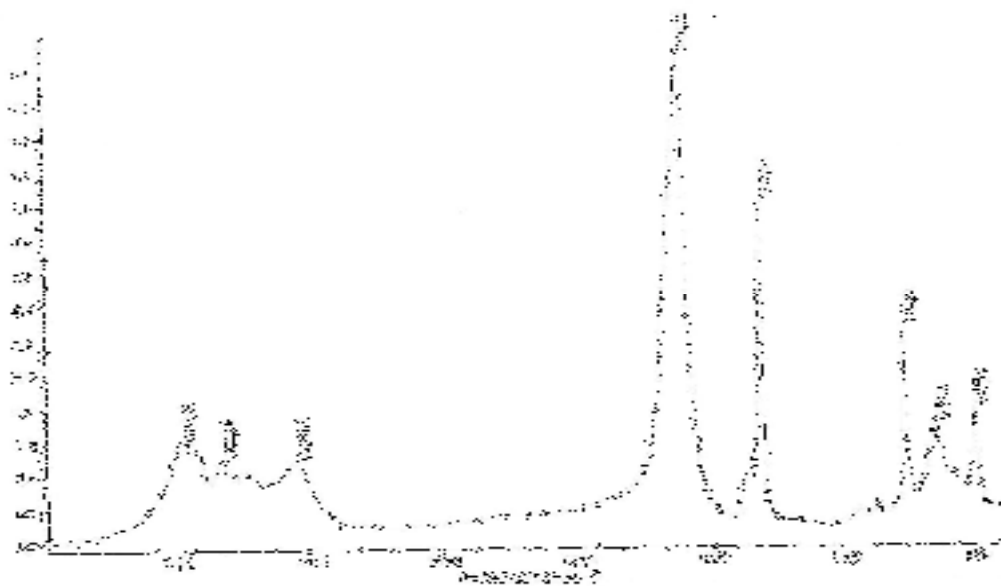
<ul style="list-style-type: none"> oxalate de calcium monohydraté 	
<ul style="list-style-type: none"> Formule Nom minéralogique Abréviation Pics caractéristiques (cm⁻¹) Pics observés (cm⁻¹) 	<p align="center">CaC₂O₄, H₂O</p> <ul style="list-style-type: none"> Whewellite Ww Pics à 1619 (TF), 1316 (F), 781(m) 3489(f), 3340(f), 3063(f), 1619 (TF), 1316 (F), 949(Tf), 885(Tf), 781(m), 661(f), 518(f)
Investigation dans l'identification du constituant	
<ul style="list-style-type: none"> Bande de vibration de C=O forte à 1619 cm⁻¹ asymétrique à gauche, en biseau. Bande de vibration C-O moyenne, fine à 1316 cm⁻¹, asymétrique à gauche. Bande de vibration de valence de H₂O en escalier de 2700 cm⁻¹ à 3500 cm⁻¹. Bande de déformation de H₂O hors du plan, fine à 781cm⁻¹. Bandes de vibrations secondaires à 518; 885 et 949 cm⁻¹. 	

F: Forte; TF: Très Forte; m: moyenne; Tf: Trop faible

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Le spectre 2 de notre échantillon en absence d'inhibiteur confirme la présence des cristaux whewellite.



Spectre 2 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur (whewellite)

En comparant notre spectre à celui du spectre de référence de la whewellite, le spectre 2 de notre culot représente les bandes caractéristiques de l'oxalate de calcium monohydraté, confirmant les résultats de l'étude morphologique.

Les bandes principales du spectre IRTF de la whewellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) du spectre 2 sont les suivantes :

- Bande de vibration de C=O forte à $1619,70 \text{ cm}^{-1}$ asymétrique à gauche.
- Bande C-O moyenne, fine à $1317,44 \text{ cm}^{-1}$ asymétrique à gauche.
- Bande de vibration de valence H_2O en escalier de 3500 à 2500 cm^{-1} .
- Bande de déformation H_2O hors du plan, fine à $781,82 \text{ cm}^{-1}$.
- Bande de vibrations secondaires à $517,84 \text{ cm}^{-1}$ et $662,10 \text{ cm}^{-1}$.

3.2. Cristallisation en présence *Nigella sativa*

3.2.1. Analyse par microscope optique

Les résultats obtenus de la cristallisation en présence de la plante à différentes concentrations sont représentés sur le tableau 6. Une bonne reproductibilité et un cv inférieur ou égal à 9% ont été assurés pour toutes les concentrations.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Tableau 6 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence de *Nigella sativa* en infusion pendant 1200s de cristallisation.

Temps (s)		5	7	12	60	120	300	600	900	1200
SI	Cr (µm)	1,25	1,875	3,335	8,886	10	10,55	10,975	10,836	10,836
	Ag (µm)	0	0	12,5	22,225	25,411	29,725	29,725	29,725	29,725
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	7,917	15,555	17,705	20,137	20,35	20,28	20,28
[NS]=4% (v/v)	Cr (µm)	1,25	1,675	2,185	5,625	6,176	7,711	7,711	7,71	7,71
	Ag (µm)	0	0	10	12,5	13,325	16,95	16,95	18,325	18,325
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,837	6,092	9,062	9,75	12,33	12,33	13,017	13,017
[NS]=5% (v/v)	I(%)	0	10,67	23,05	41,74	44,93	38,77	39,41	35,81	35,81
	Cr (µm)	0	1,25	1,875	5,831	6,375	7,995	7,995	7,995	7,995
	Ag (µm)	0	0	0	0	12,5	15,275	15,275	15,275	15,55
	T_{Moy}(µm)	0	0,625	0,937	2,915	9,437	11,635	11,635	11,635	11,772
[NS]=6% (v/v)	I(%)	100	33,3	88,16	81,26	46,7	42,22	42,82	42,63	41,95
	Cr (µm)	0	1,25	1,875	3,125	4,06	4,625	4,37	4,36	4,37
	Ag (µm)	0	0	0	0	8,75	12,3	13,325	13,56	14,225
	T_{Moy}(µm)	0	0,625	0,937	1,562	6,405	8,462	8,847	8,96	9,297
[NS]=10% (v/v)	I(%)	100	33,3	88,16	89,96	63,82	57,98	56,52	55,82	54,16
	Cr (µm)	0	1,25	1,875	3,125	3,59	3,745	3,745	3,745	3,745
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	10	10,625	10,625	10,625
	T_{Moy}(µm)	0	0,625	0,937	1,562	1,795	6,872	7,185	7,185	7,185
[NS]=20% (v/v)	I(%)	100	33,3	88,16	89,96	89,86	65,87	64,69	64,57	64,57
	Cr (µm)	0	1,25	1,875	3,125	3,354	3,354	3,354	3,354	3,354
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	7,5	7,5	7,5	7,5
	T_{Moy}(µm)	0	0,625	0,937	1,562	1,677	5,427	5,427	5,427	5,427
[NS]=50% (v/v)	I(%)	100	33,3	88,16	90,60	90,53	73,05	73,33	73,24	73,24
	Cr (µm)	0	1,25	1,875	2,925	3,354	3,354	3,354	3,354	3,354
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	6,935	6,935	6,935	6,935
	T_{Moy}(µm)	0	0,625	0,937	1,462	1,677	5,145	5,145	5,145	5,145
[NS]=80% (v/v)	I(%)	100	33,3	92,10	91,96	90,53	82,62	82,80	82,74	82,74
	Cr (µm)	0	1,25	1,25	2,5	3,354	3,354	3,354	3,354	3,354
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	3,645	3,645	3,645	3,645
	T_{Moy}(µm)	0	0,625	0,625	1,25	1,677	3,5	3,5	3,5	3,5
[NS]=100% (v/v)	I(%)	100	33,3	92,10	92,46	90,53	90,01	90,11	90,08	90,08
	Cr (µm)	0	1,25	1,25	2,345	3,354	1,25	1,25	1,25	1,25
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	2,775	2,775	2,775	2,775
	T_{Moy}(µm)	0	0,625	0,625	1,172	1,677	2,012	2,012	2,012	2,012

NS : *Nigella sativa*; SI : sans inhibiteur; T_{Moy} : taille moyenne; I(%) : inhibition

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Les tailles moyennes des cristaux d'oxalate de calcium sont représentées sous forme de courbe sur la figure ci-dessous :

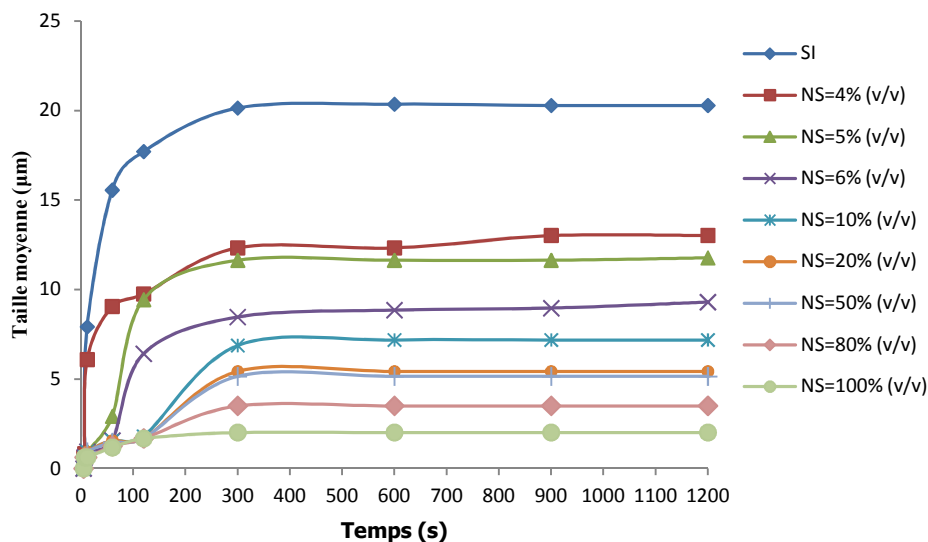


Figure 11 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence de *Nigella sativa* en infusion.

Les résultats regroupés dans le tableau 6 montrent que les cristaux se sont formés instantanément pour la concentration 4% (v/v). Par contre, à partir de la concentration de 5% (v/v), le temps de germination a été de sept secondes au lieu de cinq secondes observé en absence de l'extrait de *Nigella sativa*. On remarque qu'à la concentration de 5% (v/v), la taille des cristaux a été réduite de moitié à la fin de l'expérience (11,772 µm) pour être à son minimum de 2,012 µm pour la concentration de 100% (v/v). Par cette étude, on a pu constater l'évolution des tailles des cristaux et des agrégats durant les expériences en augmentant la concentration de la plante. On peut remarquer qu'à partir de la concentration 10% (v/v) de *Nigella*, les agrégats ne sont apparus qu'au temps égal à 300 s. La figure 11 montre que la taille moyenne des cristaux a été réduite considérablement en présence de l'extrait et dépend beaucoup de sa concentration.

Dans le tableau 7, on a regroupé les valeurs du pH mesuré au début et à la fin de chaque expérience pour chaque concentration des solutions étudiées.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

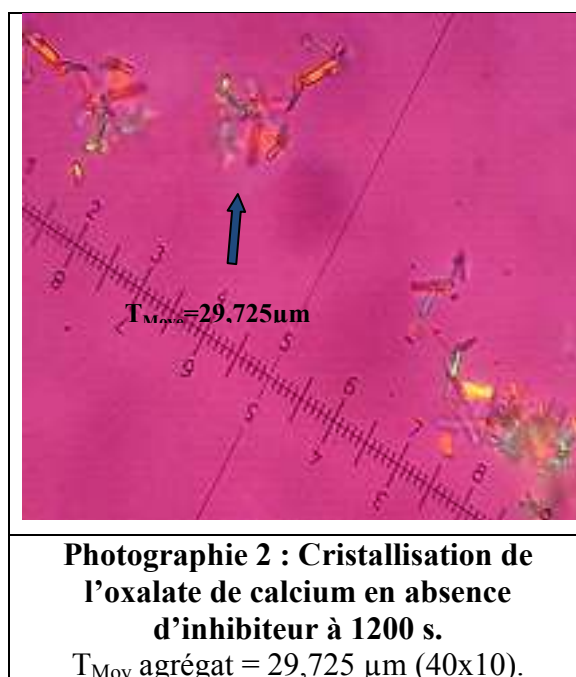
Tableau 7 : Mesure du pH de la cristallisation pour différentes concentrations de *Nigella sativa*

concentrations	pH tisane100% (v/v)	pH extrait diluée% (v/v)	pH début	pH fin
SI	/	/	5,92	6,13
4% (v/v)	6,35	5,9	6,06	6,3
5% (v/v)	6,04	5,91	6,12	6,38
6% (v/v)	6,26	5,98	6,18	6,23
10% (v/v)	6,39	6,19	6,27	6,3
20% (v/v)	6,35	6,21	6,2	6,24
50% (v/v)	6,19	5,97	6,01	6,17
80% (v/v)	6,32	6,25	6,23	6,28
100% (v/v)	6,2	6,2	6,25	6,3

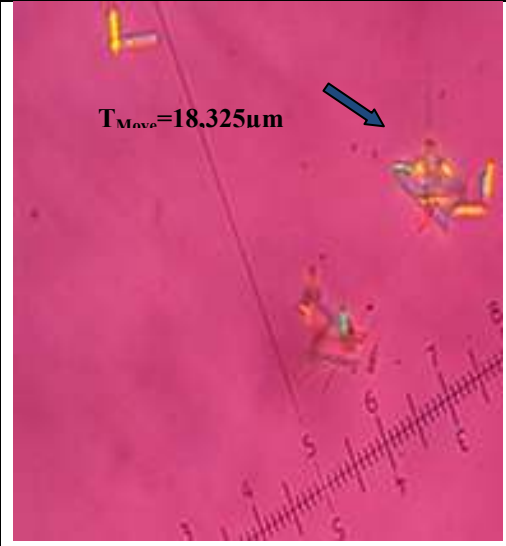
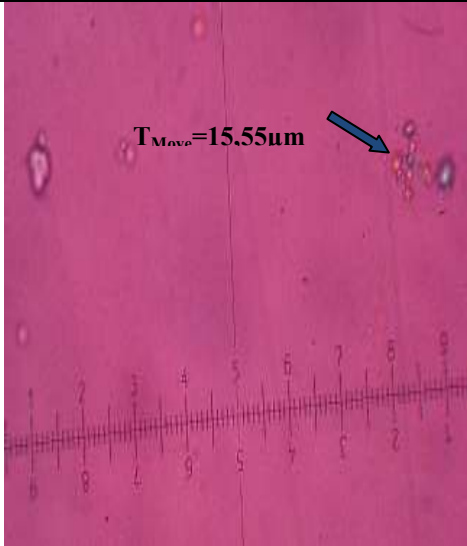
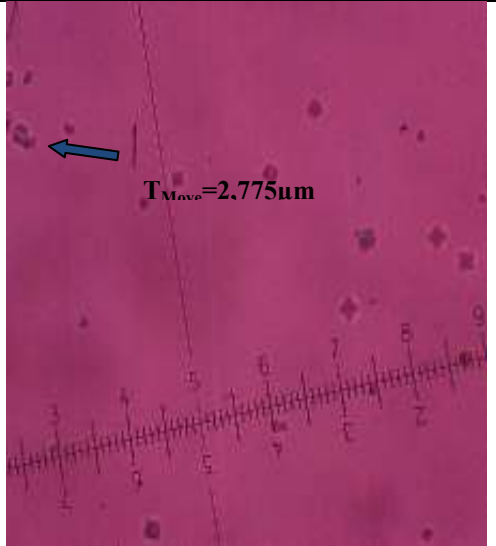
Selon le tableau 7, on note que le pH de la solution cristallisable d'oxalate de calcium n'a pas été affecté par les différentes concentrations de *Nigella sativa*. Il varie en absence de celle-ci de 5,92 à t=0s à 6,13 en fin d'expérience. La variation a été minimale même en ajoutant l'extrait de plante à différentes concentrations.

3.2.2. Etude morphologique

Les photographies 3, 4 et 5 pour les concentrations 4% (v/v), 5% (v/v) et 100% (v/v) confirment les résultats d'une diminution des tailles moyennes des cristaux. Une conversion cristalline de whewellite en wheddellite est observée à partir de la concentration 5% (v/v).



Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

		
<p>Photographie 3 : Cristallisation en présence de l'extrait de <i>Nigella</i> 4% (v/v) à t=1200 s. $T_{Moy} \text{ agrégat} = 18,325 \mu\text{m}$ (40x10).</p>	<p>Photographie 4 : Cristallisation en présence de l'extrait de <i>Nigella</i> 5% (v/v) à t=1200 s. $T_{Moy} \text{ agrégat} = 15,55 \mu\text{m}$ (40x10).</p>	<p>Photographie 5 : Cristallisation en présence de l'extrait de <i>Nigella</i> 100% (v/v) à t=1200 s. $T_{Moy} \text{ agrégat} = 2,775 \mu\text{m}$ (40x10).</p>

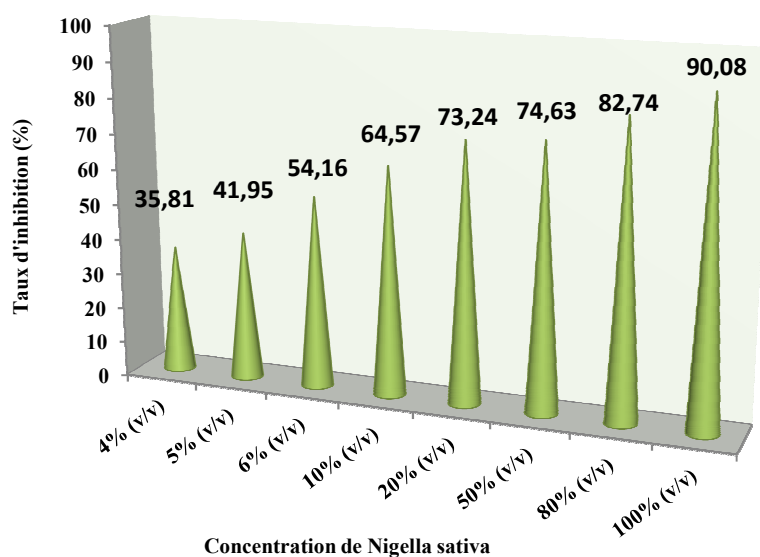
On a observé par microscopie optique à lumière polarisante durant l'étude de la cinétique de la cristallisation, la formation de whewellite et de weddellite pour les différentes concentrations de *Nigella sativa*. Sur la photographie 3, on remarque qu'à la fin de l'expérience, l'oxalate de calcium monohydraté est majoritaire pour la concentration 4% (v/v). La taille moyenne des agrégats est de 18,325 μm , elle reste inférieure à celle observée pour la cristallisation sans inhibiteur 29,725 μm . La forme générale des cristaux est restée hexagonale et rectangulaire à polarisation intense. Par contre, à partir de la concentration 5% (v/v), l'apparition de la weddellite sous forme enveloppe est dû à la conversion de l'oxalate de calcium monohydraté en oxalate de calcium dihydraté illustré sur les photographies 4 et 5.

3.2.3. Comparaison des taux d'inhibition des différentes concentrations de *Nigella sativa*

L'histogramme 1 représente le taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en fonction des différentes concentrations de *Nigella sativa*.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*



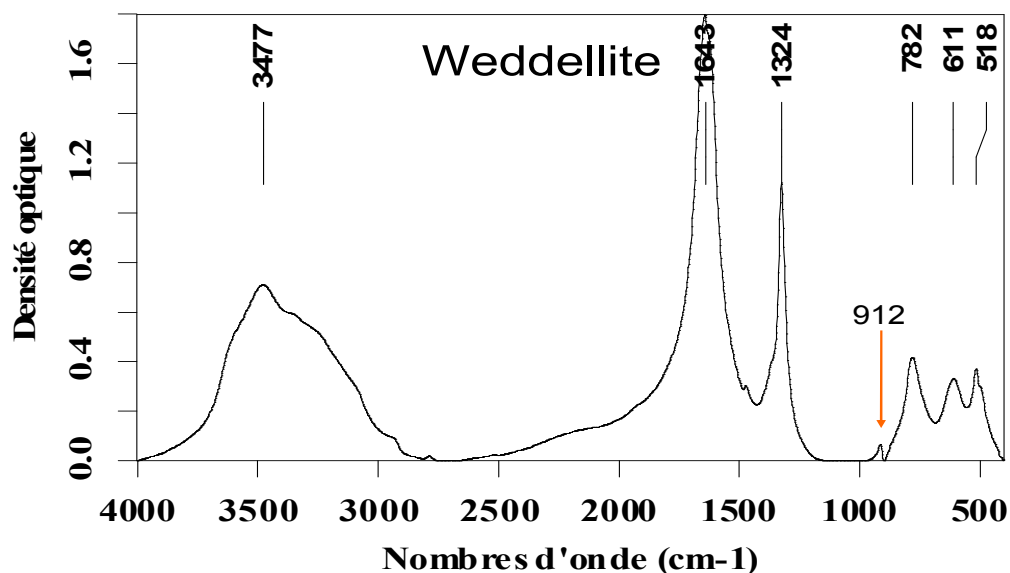
Histogramme 1 : Taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en fonction des différentes concentrations de *Nigella sativa*.

Comme le montre l'histogramme 1, on note un taux d'inhibition de 35,81% pour la concentration 4% (v/v). Tandis qu'à la concentration de 5% (v/v), on enregistre une inhibition importante des tailles moyennes de cristaux de 41,95%. L'effet de cet extrait a donné un pourcentage considérable de 90,08% pour la concentration 100% (v/v).

3.2.4. Analyse infrarouge à transformer de Fourier

La lecture du spectre obtenu après l'analyse du filtrat de la cristallisation avec la plante au temps 1200 secondes, se fait en comparant avec le spectre IRTF de référence de l'oxalate de calcium dihydraté (spectre 3).

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de Nigella sativa



Spectre 3 : Spectre infrarouge de référence de l'oxalate de calcium dihydraté

Les données spectroscopiques IRTF de weddellite sont données dans le tableau 8.

Tableau 8: Principales fréquences de vibrations de la weddellite (spectre de référence 3).

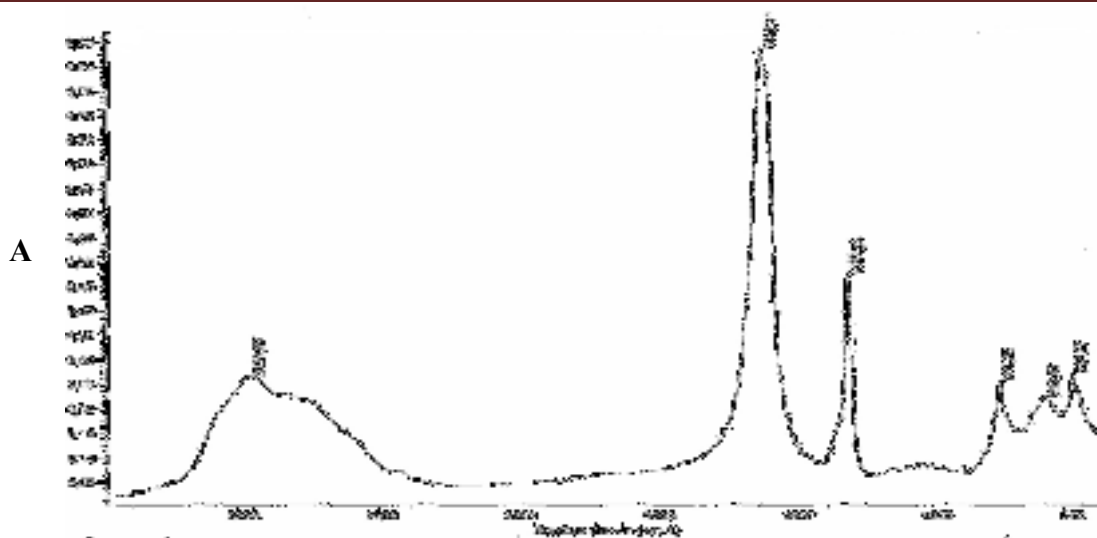
<ul style="list-style-type: none"> oxalate de calcium dihydraté 	
<ul style="list-style-type: none"> Formule Nom minéralogique Abréviation Pics caractéristiques (cm⁻¹) Pics observés (cm⁻¹) 	<p align="center">CaC₂O₄, 2H₂O</p> <ul style="list-style-type: none"> Weddellite Wd Pics à 1643 (TF), 1324 (m), 912(Tf) 3477(m), 1643 (TF), 1324 (m), 912(Tf), 782(f), 611(f), 518(f)
Investigation dans l'identification du constituant	
<ul style="list-style-type: none"> Bande de vibration de C=O forte à 1643 cm⁻¹ asymétrique à gauche, en biseau. Bande de vibration C-O moyenne, fine à 1324 cm⁻¹, asymétrique à gauche. Bandes de vibrations secondaires à 912 cm⁻¹. 	

F: Forte; TF: Très Forte; m: moyenne; Tf: Trop faible

Le spectre 4 est obtenu après l'analyse du culot de la cristallisation avec la concentration de 5% (v/v) de la plante et au temps 1200 secondes à démontré la présence de la wheddellite.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

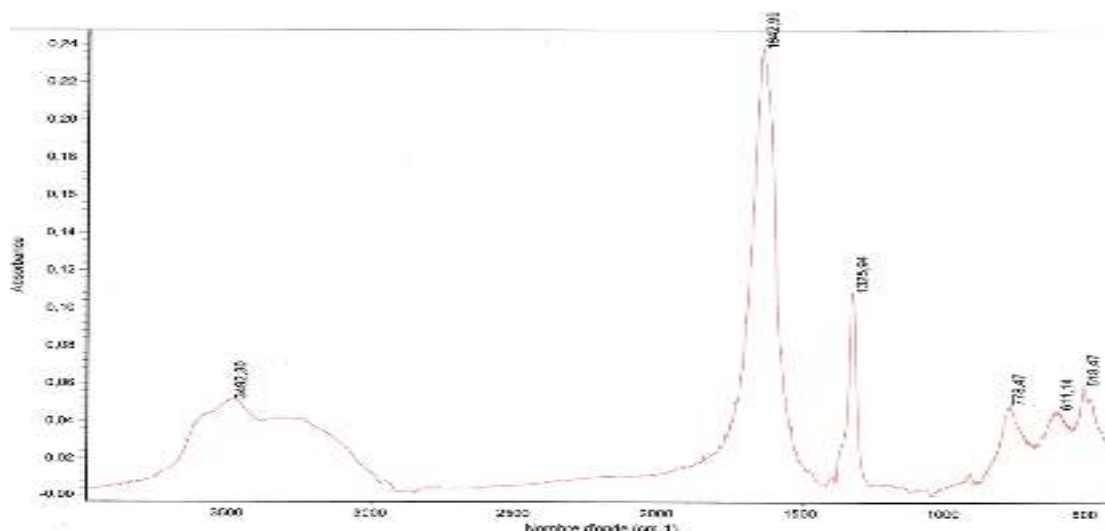
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*



Spectre 4: Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de *Nigella sativa* 5% (v/v) de composition weddellite

L'analyse spectrale du culot recueilli à la fin de l'expérience et son identification avec le spectre de référence montre que les cristaux formés sont des cristaux d'oxalate de calcium dihydraté (spectre 4). Les fréquences de bandes $1619,7\text{ cm}^{-1}$ et $1377,44\text{ cm}^{-1}$ de la whewellite sont décalées vers les fréquences $1642,91\text{ cm}^{-1}$ et $1327,28\text{ cm}^{-1}$ qui correspondent à la weddellite (spectre de référence 3). Ces résultats confirment l'étude morphologique par microscopie.

Le résultat spectral du filtrat récupéré de la cristallisation oxalocalcique à la concentration de 100% (v/v) et à la fin de l'expérience a confirmé la conversion cristalline de la whewellite en wheddellite et ceci est représenté sur le spectre 5.



Spectre 5: Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de *Nigella sativa* 100% (v/v) de composition weddellite

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

Le spectre 5 représente les bandes caractéristiques de la wheddellite, les fréquences de bandes 1619,7 cm^{-1} et 1377,44 cm^{-1} de la whewellite sont décalées vers les fréquences 1642,99 cm^{-1} et 1325,94 cm^{-1} qui correspondent à la weddellite.

3.2.5. Mesure de quantité de calcium et d'oxalate

Afin d'établir une courbe d'étalonnage, des solutions témoins de chlorure de calcium (CaCl_2) à différentes concentrations 1mg/l, 10mg/l, 20mg/l, 40mg/l et 100mg/l ont été préparées pour mesurer leur potentiel. Les valeurs obtenues sont données dans le tableau 9.

Tableau 9. Le potentiel des solutions CaCl_2 en fonction de la concentration de calcium

C(mg/l)	1	10	20	40	100
E (mv)	-102	-73,1	-63	-56	-40,6

On a calculé la quantité de calcium libérée par l'extrait de *Nigella sativa*, en se référant à la courbe d'étalonnage illustrée par la figure 12.

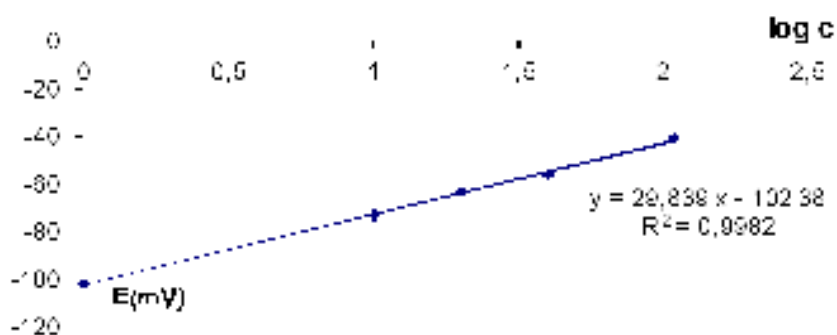


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'électrode spécifique de l'ion Ca^{+2}

À partir de la courbe d'étalonnage, on a pu calculer le taux de calcium de *Nigella sativa* obtenu qui est représenté sur le tableau 10 avec la concentration en oxalate à différentes concentrations.

Tableau 10 : Taux de calcium et d'oxalate de la *Nigella sativa*

Concentration de <i>Nigella sativa</i> (% v/v)	Calcium (mg/l)	Oxalate (mg/l)
4	10,75± 0,01	0,63± 0,01
5	13,31± 0,01	0,79± 0,01
6	16,1± 0,01	0,95± 0,01
10	27,24± 0,01	1,58± 0,01
20	54,18± 0,01	3,16± 0,01
50	134,91± 0,01	7,92± 0,01
80	215,1± 0,01	12,67± 0,01
100	268,43± 0,01	15,84± 0,01

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

On remarque sur le tableau 10, la quantité de calcium libérée par la plante est plus importante que celle de l'oxalate, ce qui implique que le ratio $[Ca^{+2}]/[C_2O_4^{-2}]$ augmente vers des valeurs plus élevées que 5. Cela peut être un facteur de cause de la conversion cristalline de l'oxalate de calcium monohydraté en oxalate de calcium dihydraté.

3.2.6. Observation au microscope à balayage électronique

Les observations par microscopie à balayage électronique nous ont permis d'identifier les cristaux retenus dans le filtrat de nos échantillons regroupés dans la figure 13.

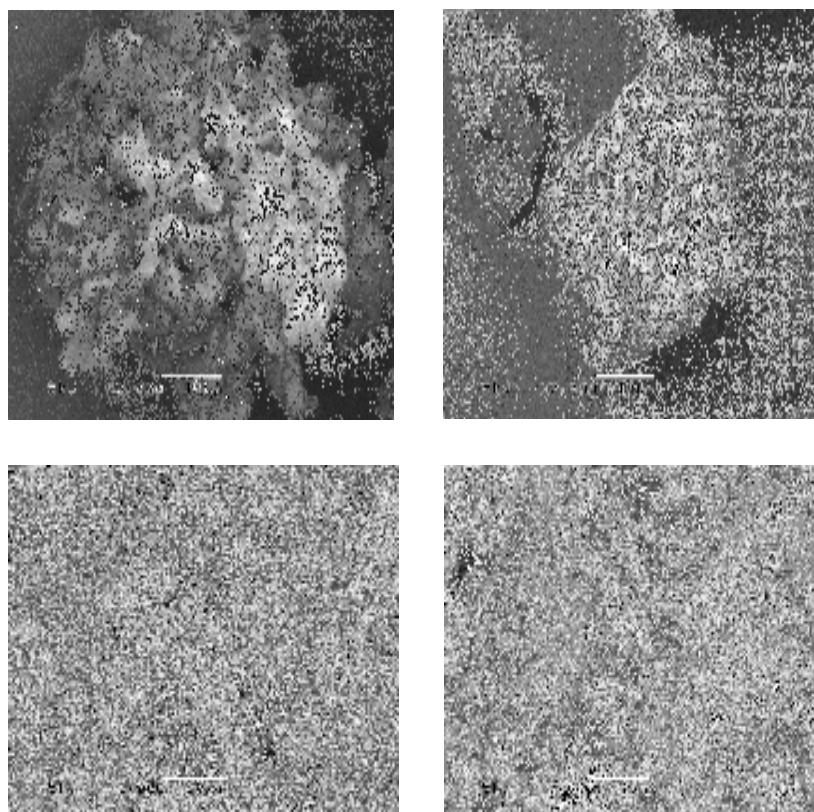


Figure 13 : Photos MEB de (a) cristallisation sans inhibiteur (b) à la concentration de NS 5% (v/v), (c) à la concentration de NS 80% (v/v) et (d) à la concentration de NS 100% (v/v).

L'observation en MEB des cristaux retenus dans le filtre de nos échantillons a révélé la présence des cristaux suivants (figure13) :

1. agrégats de cristaux d'oxalate de calcium monohydraté ou whewellite (figure 13, a) en absence de l'extrait de *Nigella sativa*;

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

2. agrégats de cristaux d'oxalate de calcium dihydraté ou weddellite de forme octaédrique (en enveloppe carrée) (figure 13, b) pour la concentration 5% (v/v) de l'extrait aqueux de *Nigella sativa*;
3. cristaux d'oxalate de calcium dihydraté, ou weddellite, de forme octaédrique (en enveloppe carrée) pour les concentrations 80% (v/v) et 100% (v/v) de l'extrait aqueux de *Nigella sativa* respectivement (figure 13, c-d).

4. Discussion

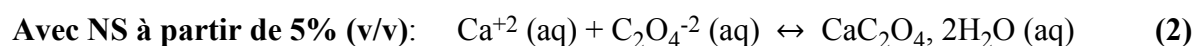
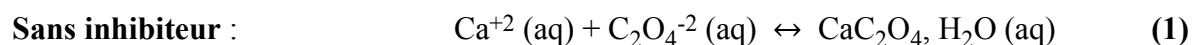
L'inhibition est un processus complexe qui est loin d'avoir livré tous ses secrets malgré les nombreux travaux qui lui ont été consacrés. Des études ont tenté d'identifier les substances ayant une activité inhibitrice sur les phases cristallines urinaires. Conformément aux recommandations de l'OMS, une attention particulière a ciblé l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement et le contrôle de différentes pathologies au cours des dernières décennies (49). Les plantes médicinales ont été utilisées de tout le temps chez les sujets atteints de la lithiase, elles sont utilisées sous forme de tisanes et leur effet le plus certain est d'augmenter la diurèse, sans que l'on puisse conclure à une action directe sur la formation des calculs ou leur éventuelle dissolution. Dans ce contexte, on a étudié l'effet de *Nigella sativa* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium, la forme la plus fréquente de la lithiase urinaire.

Dans nos essais à base d'urine artificielle, l'analyse morphologique sous microscope optique à lumière polarisée et l'analyse spectrale par infrarouge à transformée de Fourier, révèlent que, dans la cristallisation sans *Nigella sativa*, les cristaux formés étaient de la whewellite. En effet, le rapport molaire $[Ca^{+2}]/[C_2O_4^{-2}]$ est de 4 avec des concentrations étudiées en calcium et oxalate (4mM, 1 mM). D'après Jungers et al. (48, 50), ce rapport conditionne l'espèce cristalline de l'oxalate de calcium : lorsque le rapport $[Ca^{+2}]/[C_2O_4^{-2}]$ est inférieur à 5, 94 % des cristalluriques oxalocalciques comportent de la whewellite (oxalurie forte) tandis que lorsque le rapport est supérieur à 14, 99 % comportent de la weddellite (calcium fort). La plante préparée par infusion à différentes concentrations a provoqué un effet inhibiteur sur la taille moyenne des cristaux de l'oxalate de calcium. On remarque qu'elle a retardé le temps d'apparition des agrégats à partir de la concentration 10% (v/v). Le taux d'inhibition de la taille des cristaux de la whewellite est proportionnel aux concentrations de *Nigella sativa*, on en

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

registre un taux important de 85,41 % pour une concentration de 100% (v/v) de la plante. D'autres parts, la composition complexe de *Nigella sativa*, nous laisse supposer qu'un des constituants ou plusieurs sont adsorbés sur la surface du cristal pour inhiber sa croissance. Des observations faites par Curreri et al (51) ont montré l'effet inhibiteur sur la croissance cristalline des cristaux d'oxalate de calcium en se liant à la surface du cristal. La structure géométrique de la surface est susceptible d'être un facteur potentiel à la compréhension du phénomène d'inhibition, mais difficile à expliquer. Dans toutes les expériences effectuées, le pH n'a pas eu d'influence sur les cristaux, cela peut être expliqué par le fait que les oxalates de calcium sont de pH indépendants (52). L'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium peut être aussi la conséquence de la conversion cristalline observée. Cela peut être expliqué par le changement du rapport molaire $[Ca^{+2}]/[C_2O_4^{-2}]$. En effet, le rapport devient 4,26 pour une concentration de 5% (v/v) lorsque le changement de phase se fait pour devenir 8,43 lorsque la conversion cristalline est totale (concentration 100% (v/v)). Les réactions obtenues sont les suivantes :



La conversion cristalline de l'oxalate monohydraté (whewellite) vers l'oxalate dihydraté (weddellite) est du probablement à l'apport supplémentaire par *Nigella sativa* de l'ion Ca^{+2} , qui augmente proportionnellement avec la concentration utilisée de la plante. Cette étude présente un intérêt important dans la mesure où on a fait apparaître le rôle de *Nigella sativa* sur:

- 1- le retard dans la formation de l'oxalate de calcium;
- 2- la diminution des tailles des cristaux et des agrégats;
- 3- la conversion cristalline de la whewellite en weddellite.

Enfin, un point important dans la lithiase oxalo-calcique dans la mesure où lorsqu'elle est calcique dépendante (weddellite) sa prise en charge thérapeutique est plus facile et présente moins de danger que lorsqu'elle est oxalo- dépendante (whewellite), de type hyperoxalurie qui nécessite une prise en charge immédiate et peut entraîner des conséquences importantes pour le malade.

Après cette première étape de notre travail, on a jugé utile de poursuivre notre investigation sur l'effet de la vitamine C sur la cristallisation des oxalates. Cette dernière est un

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

aliment essentiel pour la santé et sa possible implication dans la formation des calculs oxalocalciques, nous a incités à vérifier son effet lithogène dans notre modèle de cristallisation *in-vitro*.

Références bibliographiques

1. Almy B, Meirik O, Schönebeck J. Incidence, Morbidity and Complications of Renal and Ureteral Calculin A Well Defined Geographical Area. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 1975;9(3):249-53.
2. Ljunghall S, Hedstrand H. Epidemiology of renal stones in a middle-aged male population. *Acta Medica Scandinavica*. 1975;197(1-6):439-45.
3. Hedenberg I. Renal and ureteral calculi, a study of the occurrence in Sweden during 1911-1938 with some notes on the geographical distribution. *Acta Chirurgica Scandinavica*. 1951;101(1):17-36.
4. Johnson CM, Wilson DM, O'Fallon WM, Malek RS, Kurland LT. Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kidney international*. 1979;16(5):624-31.
5. Hassani MA, Hennequin C, Lacour B, Daudon M. Citraturie et cristallurie de weddellite. *Progrès en Urologie*. 2005;15:650-5.
6. Driouch A, Djelloul A, Kaid-Omar Z, Semmoud A, Rais A, Addou A. Optimized experimental design for the inhibition of calcium oxalate using a turbidimetric model. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2008;3(4):425-31.
7. Kaid-Omar Z, Belouatek A, Driouch A, Taleb-Bendiab H, Lacour B, Addou A, et al. Effets de la cure de diurèse sur l'expulsabilité spontanée des calculs urinaires, le pH urinaire et la cristallurie des patients lithiasiques. *Progrès en Urologie*. 2001;11:450-7.
8. Daudon M, Bader C, Jungers P. Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microscopy*. 1993;7(3):1081-106.
9. Lewandowski S, Rodgers AL. Idiopathic calcium oxalate urolithiasis: risk factors and conservative treatment. *Clinica Chimica Acta*. 2004;345(1-2):17-34.
10. Leusmann DB, Blaschke R, Schmandt W. Results of 5035 stone analyses: a contribution to epidemiology of urinary stone disease. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 1990;24(3):205-10.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

11. Grohe B, Rogers KA, Goldberg HA, Hunter GK. Crystallization kinetics of calcium oxalate hydrates studied by scanning confocal interference microscopy. *Journal of crystal growth*. 2006;295(2):148-57.
12. Das I, Gupta S, Pandey V, Ansari SA. Inhibition and dissolution of calcium oxalate crystals by *Berberis Vulgaris-Q* and other metabolites. *Journal of crystal growth*. 2004;267(3-4):654-61.
13. Parent X, Boess G, Brignon P. Lithiase oxalocalcique. Relation entre facteurs de risque biochimiques et phase cristalline du calcul. *Progrès en Urologie*. 1999;9(6):1051-6.
14. Abdelmalek F, Harrache D, Addou A, Taleb S, Semmoud A. Étude par turbidimétrie de la cristallisation oxalocalcique en présence de quelques inhibiteurs. *Physical and Chemical News*. 2001;1:96-107.
15. Joshi V, Parekh B, Joshi M, Vaidya A. Herbal extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata* inhibit growth of calcium oxalate monohydrate crystals in vitro. *Journal of Crystal Growth*. 2005;275(1-2):e1403-e8.
16. Kacem B, Kaid-Omar Z, Daudon M, Semmoud A, Lacour B, Bougeard D, et al. Comparison of crystalluria in patients drinking either free or controlled water intake. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*. 2004;2:93-8.
17. Hennequin C, Lalanne V, Daudon M, Lacour B, Druke T. A new approach to studying inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *Urological research*. 1993;21(2):101-8.
18. Liang M, Bai Y, Huang L, Zheng W, Liu J. Inhibition of the crystal growth and aggregation of calcium oxalate by elemental selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;74(1):366-9.
19. Atmani F, Khan S. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Bju International*. 2000;85(6):621-5.
20. Freitas A, Schor N, Boim MA. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation. *BJU international*. 2002;89(9):829-34.
21. Taşkin MK, Çaliskan ÖA, Anil H, Abou-Gazar H, Khan IA, BEDİR E. Triterpene saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish Journal of Chemistry*. 2005;29(5):561-9.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

22. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*. 2000;143(3):219-26.
23. Randhawa MA, Al-Ghamdi MS. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pak J Med Res*. 2002;41(2):77-83.
24. Wichtl M, Anton R. *Plantes thérapeutiques: Tech & Doc*; 1999.
25. Babayan V, Koottungal D, Halaby G. Proximate analysis, fatty acid and amino acid composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Food Science*. 1978;43(4):1314-5.
26. El-Zawahry B. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn seed. effect of *Nigella sativa* on certain aspects of metabolism after feeding normal and hyperlipidemic diet in adult and old animals [MD thesis in medical basic sciences] Cairo, Egypt: Al-Azhar University. 1997:16-28.
27. Benkaci-Ali F, Baaliouamer A, Meklati BY, Chemat F. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour and fragrance journal*. 2007;22(2):148-53.
28. Nair SC, Salomi M, Panikkae B, Panikkar K. Modulatory effects of *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 1991;31(1):75-83.
29. Kumar TS, Negi P, Sankar KU. Antibacterial Activity of " *Nigella sativa* L." Seed Extracts. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2010;1(2):96-100.
30. Arici M, Sagdic O, Gecgel U. Antibacterial effect of Turkish black cumin (*Nigella sativa* L.) oils. *Grasas y Aceites*. 2005;56(4):259-62.
31. Salomi M, Nair SC, Panikkar K. Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. 1991.
32. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007;40(6):839-47.
33. Meiouet F, El Kabbaj S, Daudon M. Étude in vitro de l'activité litholytique de quatre plantes médicinales vis-à-vis des calculs urinaires de cystine. *Progrès en urologie*. 2011;21(1):40-7.
34. Baba Aissa F. *Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident"*, Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alger. 1999.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa*

35. Jungers P, Daudon M, Le Duc A. Epidémiologie de la lithiase urinaire. Lithiase urinaire Paris: Flammarion médecine-sciences. 1989:1-34.
36. Lartillot S, Vogel C. Dosage de l'acid oxalique de l'urine et de calculs urinaires par une méthode enzymatique colorimétrique. Feuilles de Biologie. 1980;21:43.
37. Ali-Mokhnache S. Etude et application de quelques électrodes ioniques spécifiques au contrôle de la pollution des eaux.
38. Durst RA. Ion-selective electrodes: proceedings: US National Bureau of Standards; for sale by the Supt. of Docs., US Govt. Print. Off., Washington; 1969.
39. Beaucher E, Bourmault P, Mekmene O, Gaucheron F, editors. Dosage du calcium ionique dans les produits laitiers liquides par une électrode spécifique. Journée de la mesure et de la métrologie; 2010.
40. Daudon M. Analyse des calculs par spectrophotométrie infrarouge: avantages et limites de la méthode. Ann Biol Clin. 1978;36:469-75.
41. Haux P, Natelson S. Identification of renal calculi on micro samples by infrared analysis. Microchemical Journal. 1970;15(1):126-37.
42. Nguyen Quy D, Daudon M. Infrared and Raman spectra of calculi. Paris: Elsevier; 1997.
43. Hannache B. La lithiase urinaire: Épidémiologie, rôle des éléments traces et des plantes médicinales: Paris 11; 2014.
44. v Ardenne M. Das Elektronen-Rastermikroskop, Theoretische Grundlagen. Z Phys. 1938;109:553.
45. McMullan D. Scanning electron microscopy 1928–1965. Scanning. 1995;17(3):175-85.
46. Smith K, Oatley C. The Scanning Electron Microscope and Its Fields of Application. Adv Imaging Electron Phys. 2004;133:111-25.
47. Brisset F. Microscopie électronique à balayage et microanalyses: EDP sciences; 2012.
48. Daudon M, Jungers P, Lacour B, editors. Intérêt clinique de l'étude de la cristallurie. Annales de Biologie Clinique; 2004.
49. Benhelima A. Etude chimique et biologique des substances naturelles extraites par phytochimie et leur effets sur les germes et cristaux oxalo-calciques 2017. Thèse de doctorat.
50. Daudon M, Jungers P. Clinical value of crystalluria and quantitative morphoconstitutional analysis of urinary calculi. Nephron Physiology. 2004;98(2):p31-p6.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 1 : Inhibition oxalocalcique par l'extrait de Nigella sativa

51. Curreri P, Onoda G, Finlayson B. A comparative appraisal of adsorption of citrate on whewellite seed crystals. *Journal of Crystal Growth*. 1981;53(1):209-14.
52. Daudon M, Jungers P, Lacour B, editors. Clinical value of crystalluria study. *Annales de biologie clinique*; 2004.

Chapitre II

Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Chapitre II

Partie 2 : L'effet inhibiteur de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

1. Introduction

Beaucoup d'hommes et de femmes consomment des compléments alimentaires comme la vitamine C, pour renforcer leur état de santé et prévenir ou se traiter des maladies. La vitamine C aussi appelée acide ascorbique se trouve dans la plupart des fruits et légumes (1, 2). C'est une vitamine essentielle que le corps ne peut fabriquer et doit l'obtenir par le biais de l'alimentation qui en fournit plus de 90%. L'acide ascorbique est un indicateur important pour déterminer la qualité des fruits, car c'est une substance facilement dégradable par l'atmosphère, l'oxygène et les enzymes. Elle est la moins stable parmi les vitamines et est très sensible à la lumière, à l'air et à la chaleur, c'est une molécule soluble dans l'eau (3-6).

La vitamine C est fréquemment utilisée pour prévenir la grippe et des pathologies aussi diverses que le diabète, l'asthme, les maladies cardiovasculaires et cancéreuses, en raison de son rôle antioxydant (4, 5, 7, 8). Cette généralisation fait que la vitamine C pourrait augmenter le risque de formation de calculs d'oxalate de calcium en raison de sa conversion enzymatique en oxalate. Des études évaluant l'effet de cette vitamine sur la lithogénèse et son utilisation comme acidifiant des urines pour le traitement des infections urinaires (9-15) ont produits des résultats contradictoires. Le régime alimentaire peut affecter la concentration de certaines substances dans notre urine, c'est pourquoi dans notre étude, quelques jus de fruits contenant de la vitamine C ont été testés sur les cristaux d'oxalate de calcium.

Le présent travail est divisé en deux étapes :

La première étape : détermination et comparaison de la teneur en vitamine C des jus de différents agrumes fraîchement préparés tels que les oranges au goût sucrées et commodes à avaler, ainsi que les citrons jaunes et verts et les pamplemousses au goût amer et aigre.

Pour déterminer le taux d'acide ascorbique, de nombreuses méthodes ont été établies sur la base de sa propriété réductrice. On y retrouve la méthode de titration (1, 16), de fluorimétrie, de

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

chromatographique et d'électrochimique (17-19). Dans notre étude, on a utilisé la méthode de titrage directe, contrairement à d'autres méthodes, elle est peu coûteuse, simple et fiable. Aucune extraction ni aucun prétraitement d'échantillon n'est nécessaire avant le titrage. Il semblerait que les méthodes d'analyse par titrage continuent à dominer les pharmacopées existantes (20).

Seconde étape : évaluation de l'effet de ces jus ainsi que la vitamine C commerciale et l'acide ascorbique pur, sur des urines artificielles formées de cristaux d'oxalate de calcium monohydraté. Pour cela, on a vérifié leur taille et on a suivi leur cinétique. On a procédé à l'identification des cristaux par infrarouge à transformée de Fourier et par prise de photographies.

2. Matériel et méthode

2.1. Vitamine C

La vitamine C est une vitamine qui participe aux processus métaboliques du corps. Elle a un pouvoir antioxydant et protège le corps des effets néfastes des radicaux libres. Elle joue un rôle anti-infectieux très important en renforçant nos défenses immunitaires, c'est une vitamine qui améliore la résistance aux stress et favorise l'absorption du fer présent dans les aliments (1, 8, 17, 19, 21-23).

Elle est impliquée dans la croissance et la réparation des tissus. Elle crée du collagène, une protéine importante pour la qualité de la peau et celle du cartilage, des tendons, des ligaments ainsi que des vaisseaux sanguins. Elle est également utile pour guérir les plaies, réparer les os, les dents ou encore la gencive (17, 24). Un manque de vitamine C dans le régime peut provoquer la maladie appelée scorbut, qui peut être évitée avec seulement 10 mg de vitamine C par jour. Le scorbut est connu depuis les anciens temps, la marine britannique a commencé à donner aux marins du jus de citron vert pour se prévenir de cette maladie en 1775. L'acide ascorbique a finalement été isolé en 1932 et synthétisé commercialement en 1934 (25-27). En outre, le rôle de la vitamine C est également de protéger contre les maladies cardiaques, de normaliser le taux de cholestérol et de jouer un rôle actif et important dans la prévention du cancer (17, 19, 21, 23).

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

2.2. Préparation des jus de fruit, de la vitamine C commerciale et de l'acide ascorbique pur

Pour notre étude, différents fruits orange, citron jaune, citron vert et pamplemousse (figure 14) ont été achetés sur le marché local des fruits et légumes de Mostaganem dans la période de janvier 2014. Les échantillons ont d'abord été lavés à l'eau, ensuite coupés transversalement en deux et pelés pour être pressés et déchargés de leur jus dans un béccher prélevé. Les graines ont été soigneusement prélevées du jus de fruits fraîchement préparé avant de les dilués dans de l'eau distillée à des concentrations volumiques de 5% (v/v), 10% (v/v), 25% (v/v) et 50% (v/v). La vitamine C commerciale en comprimé et l'acide ascorbique pur de marque Merck (figure 15) ont été préparés avec les doses 0,5g, 1g, 1,5g et 2g/jour (28), pour tester leur effet sur les cristaux d'oxalate de calcium.

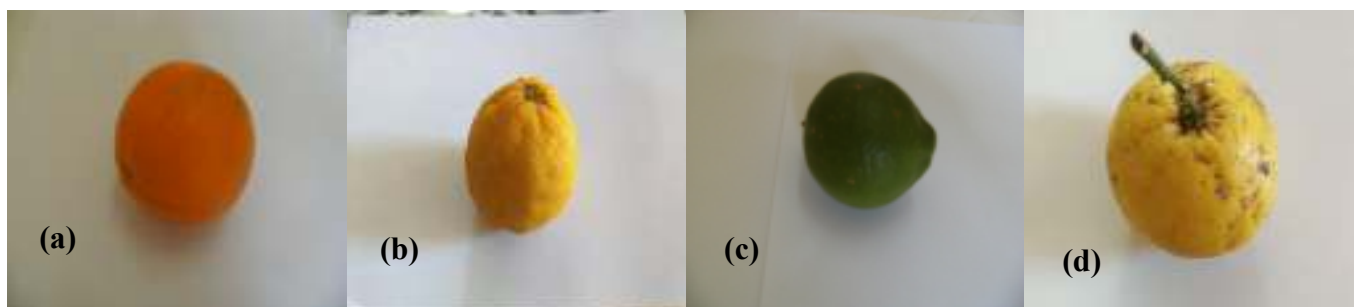


Figure 14: fruits testés (a) : Orange, (b) : Citron Jaune, (c) : Citron Vert, (d) : Pamplemousse.



Figure 15 : (a) : Vitamine C commerciale, (b) : Acide ascorbique pur

2.3. Teneur en acide ascorbique des jus de fruits

Le but de ce travail est de déterminer ainsi que de comparer la teneur en acide ascorbique de plusieurs jus de fruits naturels fraîchement préparés. Pour cela, on a utilisé la méthode d'analyse volumétrique déjà effectuée par Izuagie et al (1). Une concentration de $5,6076 \times 10^{-3}$ M

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

de solution d'iode, a été préparée en mélangeant 0,2 g de KIO_3 avec 1,6 g de KI dissout dans un volume de 500 ml d'eau distillée. La solution a été acidifiée avec 1 ml d'acide sulfurique concentré, le tout bien mélangé et conservé dans un endroit sombre. 25 ml de jus a été versé dans un erlenmeyer pour être titré par une solution d'iode en utilisant l'amidon fraîchement préparé comme indicateur. L'apparition de la couleur bleue indique que la réaction est finie.

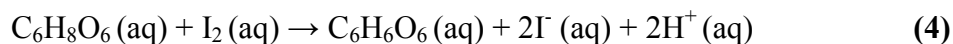
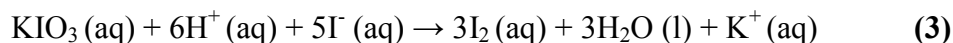
2.4. Inhibition de la cristallisation d'oxalate de calcium par les jus de fruits, la vitamine C commerciale et l'acide ascorbique pur

On a appliqué le modèle de l'inhibition oxalocalcique par l'extrait de *Nigella sativa* avec le même protocole et les mêmes conditions, sur l'effet des jus de fruits avec les concentrations précédentes. On a respecté le volume final du mélange de 300 ml et les concentrations respectives du mélange en calcium et oxalate de 4mM et 1mM (29). Les expériences ont été répétées plus de 3 fois, le nombre d'essais permet d'estimer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (cv). L'étude consiste à mesurer la taille moyenne des cristaux et des agrégats, à prendre des photographies et à confirmer les résultats avec l'infrarouge à transformée de Fourier

3. Résultats.

3.1. Teneur en acide ascorbique des jus de fruits

La vitamine C est un agent réducteur qui accepte des électrons d'un donneur. La réaction (1) nécessite une source d'iodure dissout (I^-), qui sera fournie en ajoutant un excès d'iodure de potassium KI au mélange réactionnel. La réaction (3) génère de l'iode aqueux I_2 (aq), qui est utilisé pour oxyder la vitamine C ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) en réaction (4). La réaction nécessite de l'acide sulfurique concentré, ajouté au mélange réactionnel. Cette classe de réaction est celle d'une oxydoréduction. Les cv obtenus restent inférieurs à 10%.



Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Les teneurs en vitamine C ont été calculées et trouvées différentes pour chacun des quatre fruits consommés dans la région locale. Le tableau 11 représente ces résultats avec le pH des agrumes.

Tableau 11 : Teneur en vitamines C des agrumes testés.

Fruits	pH du Jus	Volume du jus (ml)	Volume du jus testé (ml)	Volume de la solution I ₂ consommée (ml)	La concentration molaire de la vitamine C dans les Jus (M)
Orange	3,50	150	25	18	$4,0 \times 10^{-3}$
Citron jaune	2,43	46	25	16,1	$3,6 \times 10^{-3}$
Pamplemousse	3,05	130	25	10	$2,2 \times 10^{-3}$
Citron vert	2,45	25	25	16,9	$3,8 \times 10^{-3}$

La concentration est aussi calculée en mg/100ml et mg/l qu'on peut retrouver sur le tableau 12.

Tableau 12 : Concentration de la vitamine C en mg/100ml et mg/l des différents agrumes.

Fruits	La concentration molaire de la vitamine C dans les jus	
	mg/100ml	mg/l
Orange	70,4	704
Citron jaune	63,4	634
Pamplemousse	38,7	387
Citron vert	66,9	669

La plus forte concentration d'acide ascorbique a été observée dans le jus d'orange, suivi du citron vert, ensuite du citron jaune et enfin du pamplemousse qui reste la plus faible.

Une étude (30) en Nigeria a été réalisée sur l'estimation quantitative par titrage oxydoréduction de l'acide ascorbique dans les jus des oranges, des citrons et des pamplemousses mûrs et non mûrs. Elle a démontré que l'orange a la teneur la plus élevée suivie du citron et enfin du pamplemousse, ce qui est en concordance avec nos résultats. Une autre étude faite par Izuagie et al (1) a démontré que le jus d'orange a la plus forte concentration qui est de 600 mg/l d'acide ascorbique que celle du jus de citron qui est de 306 mg/l. Tandis qu'en Ethiopie, Dereje Alemu Bekele et al (31) ont découvert que le jus de citron contient un taux plus important d'acide ascorbique que celui de l'orange.

Concernant la vitamine C et l'acide ascorbique, le tableau 13 englobe la concentration, la masse et le pH.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Tableau 13 : Le pH et la masse de la vitamine C commerciale et de l'acide ascorbique pur.

la Vitamine C commerciale				
	0,5g/100ml	1g/100ml	1,5g/100ml	2g/100ml
pH	4,21	4,18	3,9	3,67
Masse du comprimé (g)	0,9053	1,9834	3,001	4,0083
Acide ascorbique pur				
	0,5g/100ml	1g/100ml	1,5g/100ml	2g/100ml
pH	2,85	2,70	2,56	2,61

3.2. Inhibition de la cristallisation oxalocalcique en présence des jus de fruits, de la vitamine C commerciale et de l'acide ascorbique pur

3.2.1. Jus d'orange

3.2.1.1. Analyse par microscope optique

Le suivi de la cinétique d'inhibition des tailles moyennes des cristaux d'oxalate de calcium par le jus d'orange a donné les résultats qui sont représentés dans le tableau 14. Le cv reste inférieur à 10%.

Tableau 14 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus d'orange à différentes concentrations pendant 1200s de cristallisation.

Temps	(s)	5	7	12	60	120	300	600	900	1200
SI	Cr (µm)	1,25	1,875	3,335	8,886	10	10,55	10,975	10,836	10,836
	Ag (µm)	0	0	12,5	22,225	25,411	29,725	29,725	29,725	29,725
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	7,917	15,555	17,705	20,137	20,35	20,28	20,28
[O]=5%(v/v)	Cr (µm)	0	1	2,5	8	7	7	6	6	5
	Ag (µm)	0	0	0	14	17	17	16,5	16,5	15
	T_{Moy}(µm)	0	0,5	1,25	11	12	12	11,25	11,25	10
	I(%)	100	46,64	84,21	29,28	32,22	40,41	44,72	44,53	50,69
[O]=10%(v/v)	Cr (µm)	0	1	2,5	8	7	7	6	6	5
	Ag (µm)	0	0	0	14	17	17	16,5	16,5	15
	T_{Moy}(µm)	0	0,5	1,25	11	12	12	11,25	11,25	10
	I(%)	100	46,64	84,21	29,28	32,22	40,41	44,72	44,53	50,69
[O]=25%(v/v)	Cr (µm)	0	1	2,5	8	8	8	6	6	5
	Ag (µm)	0	0	0	14	11	11	15	15	15
	T_{Moy}(µm)	0	0,5	1,25	11	11	11	10,5	10,5	10
	I(%)	100	46,64	84,21	29,28	37,87	45,37	48,40	48,22	50,69
[O]=50%(v/v)	Cr (µm)	0	1	2,5	4	4	4	3	3	3
	Ag (µm)	0	0	0	10	10	10	9	9	9
	T_{Moy}(µm)	0	0,5	1,25	7	7	7	6	6	6
	I(%)	100	46,64	84,21	55	60,46	65,24	70,52	70,41	70,41

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

La figure 16 montre bien d'une façon générale l'effet du jus d'orange sur la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté à différentes concentrations.

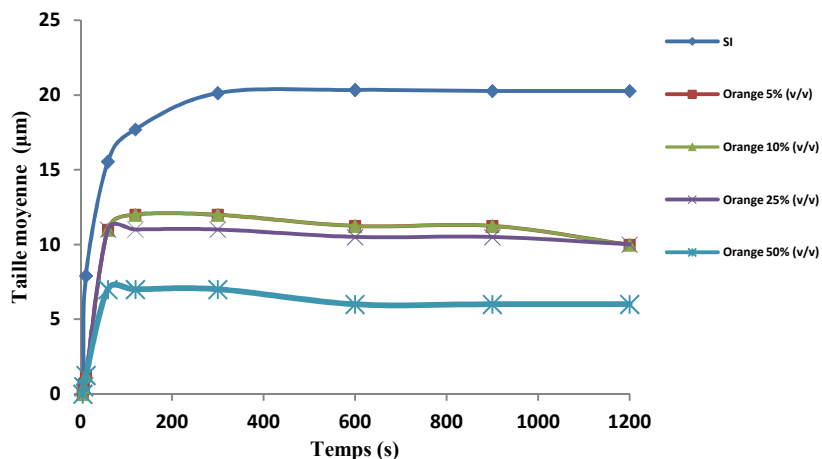


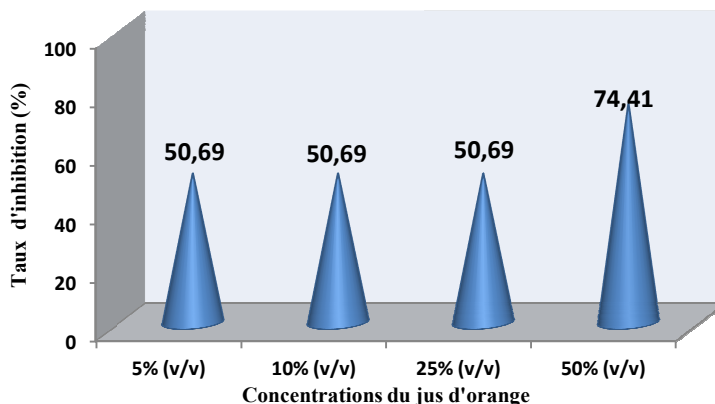
Figure 16 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus d'orange.

SI : sans inhibiteur

L'effet du jus d'orange se remarque dès la première concentration, sur la taille moyenne des cristaux et des agrégats. L'ajout du jus d'orange, selon le tableau 14, a décalé le temps d'induction à 7 s, au lieu de 5 s de la cristallisation sans inhibiteur et ralenti l'apparition des agrégats jusqu'au temps $t=60$ s. Le jus a réduit la taille moyenne des cristaux et des agrégats d'oxalate de calcium dès les premières secondes. La taille moyenne des cristaux a été réduite de $20,28 \mu\text{m}$ sans inhibiteur à $6 \mu\text{m}$ au temps 1200 s pour une concentration de 50% (v/v). Cette concentration a favorisé la conversion cristalline de la whewellite en weddellite. D'une façon générale, avec l'augmentation de la concentration, les cristaux diminuent de taille ce qu'on peut observer sur la figure 16.

L'inhibition des cristaux de la durée de l'expérience de la cristallisation en présence du jus d'orange est représentée par l'histogramme 2.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

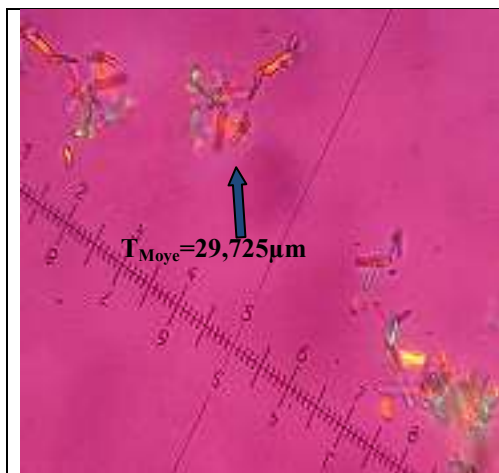


Histogramme 2: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus d'orange.

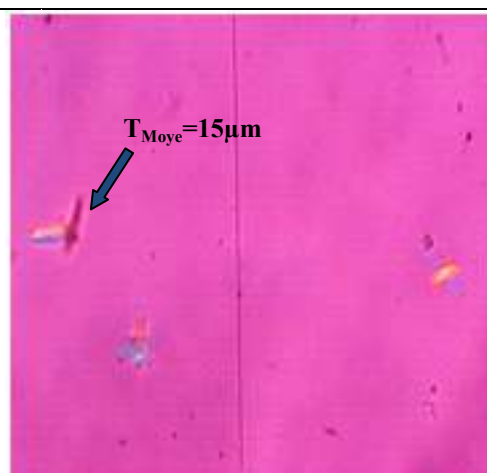
On remarque sur l'histogramme 2, que pour les trois premières concentrations le taux d'inhibition des tailles cristaux d'oxalate de calcium, reste constant de 50,69%. Alors qu'à la concentration de 50% (v/v), le pourcentage d'inhibition augmente pour devenir 74,41% ce qui est important.

3.2.1.2. Etude morphologique

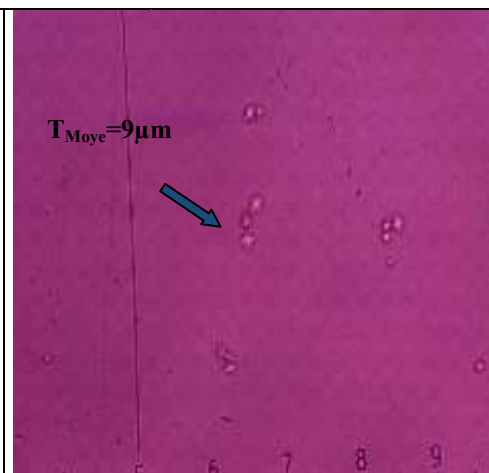
Les photographies ci-dessous illustrent l'effet du jus d'orange sur les particules d'oxalate de calcium aux concentrations 10% (v/v) et 50% (v/v). Une conversion cristalline est observée.



Photographie 6 : Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s.
 T_{Moy} agrégat = 29,725 μ m (40x10).



Photographie 7 : Cristallisation en présence du jus d'orange 10% (v/v) à t=1200 s.
 T_{Moy} agrégat = 15 μ m (40x10).

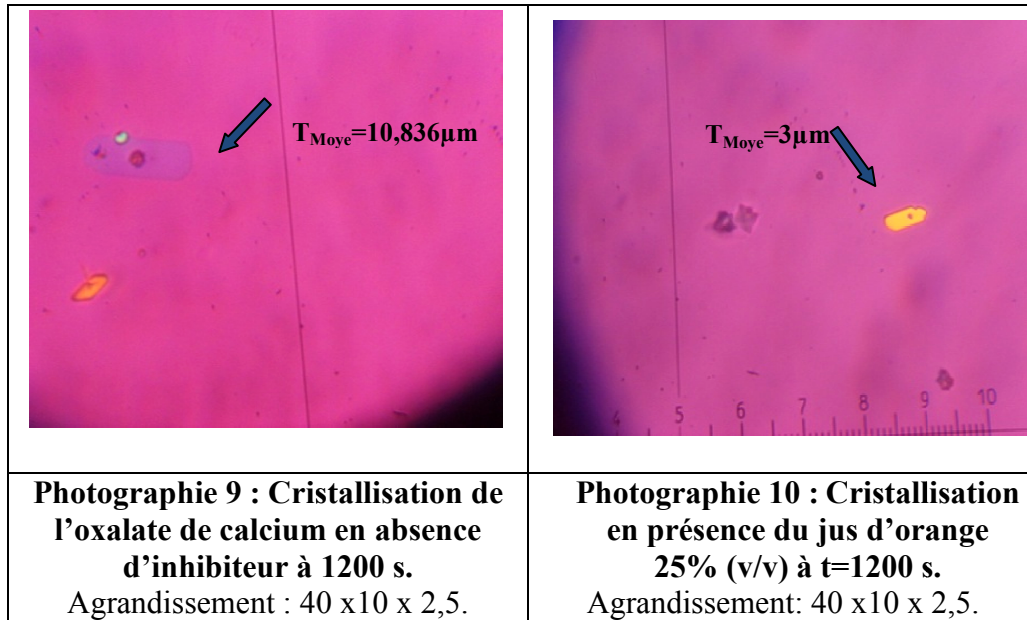


Photographie 8 : Cristallisation en présence du jus d'orange 50% (v/v) à t=1200 s.
 T_{Moy} agrégat = 9 μ m (40x10).

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

L'effet du jus d'orange sur la surface du cristal d'oxalate de calcium monohydraté pour la concentration 25% (v/v) est représenté sur la photographie 10.



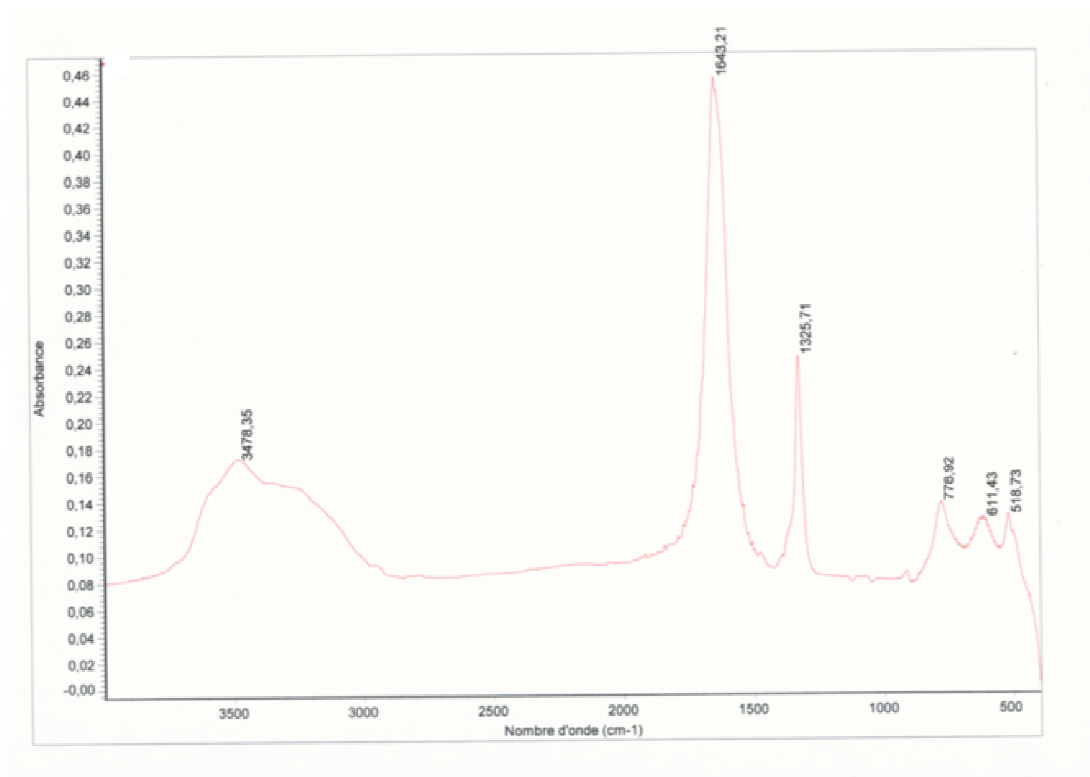
Sur la photographie 7, on note une diminution des tailles des particules et des agrégats de la whewellite par rapport à la cristallisation sans inhibiteur. La taille des agrégats est de 9 µm pour la concentration 50% (v/v). La forme générale des cristaux est restée la même, hexagonale et rectangulaire. L'effet du jus s'observe sur la surface des cristaux ce qu'on peut voir sur la photographie 10. Enfin, un début de conversion de whewellite en wheddellite sous forme d'enveloppe a été observé sur les photographies 8 et 10 pour une concentration de 50% (v/v) du jus d'orange.

3.2.1.3. Analyse infrarouge à transformée de Fourier

Sur le spectre 6 du culot récupéré, on remarque la présence de wheddellite pour la cristallisation oxalocalcique avec une concentration de 50% (v/v) de jus d'orange à la fin des expériences.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium



Spectre 6 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence du jus d'orange 50% (v/v) de composition weddellite + whewellite (traces)

Le spectre 6 du culot recueilli à la fin de l'expérience montre que les cristaux formés sont des oxalates de calcium dihydraté. Les pics $1643,21 \text{ cm}^{-1}$ et $1325,71 \text{ cm}^{-1}$ correspondant à la weddellite remplacent les pics $1619,70 \text{ cm}^{-1}$ et $1317,44 \text{ cm}^{-1}$ de la whewellite de notre urine artificielle sans inhibiteur, confirmant ainsi les observations faites par l'analyse microscopique.

3.2.2. Jus de citron jaune

3.2.2.1. Analyse par microscope optique

Le suivi des tailles moyennes des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus de citron jaune est représenté dans le tableau 15. Le cv obtenu est inférieur à 10%.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Tableau 15 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de citron jaune à différentes concentrations pendant 1200s de cristallisation.

Temps (s)		5	7	12	60	120	300	600	900	1200
SI	Cr (µm)	1,25	1,875	3,335	8,886	10	10,55	10,975	10,836	10,836
	Ag (µm)	0	0	12,5	22,225	25,411	29,725	29,725	29,725	29,725
	T _{Moy} (µm)	0,625	0,937	7,917	15,555	17,705	20,137	20,35	20,28	20,28
[CJ]=5%(v/v)	Cr (µm)	0	0	1,5	4	4	4	5	5	5
	Ag (µm)	0	0	3,5	9	11	12	15	15	15
	T _{Moy} (µm)	0	0	2,5	6,5	7,5	8	10	10	10
	I(%)	100	100	68,42	58,21	57,64	60,27	50,86	50,69	50,69
[CJ]=10%(v/v)	Cr (µm)	0	0	1,5	2	2	2	1,5	1,5	1,5
	Ag (µm)	0	0	3,5	4	4	4	3,5	3,5	3,5
	T _{Moy} (µm)	0	0	2,5	3	3	3	2,5	2,5	2
	I(%)	100	100	68,42	80,71	83,05	85,10	87,71	87,67	90,14
[CJ]=25%(v/v)	Cr (µm)	0	0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T _{Moy} (µm)	0	0	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
	I(%)	100	100	84,21	91,96	92,94	93,79	93,86	93,84	93,84
[CJ]=50%(v/v)	Cr (µm)	0	0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2	2
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T _{Moy} (µm)	0	0	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1	1
	I(%)	100	100	84,21	91,96	92,94	93,79	93,86	95,07	95,07

CJ : Citron Jaune; SI : sans inhibiteur; T_{Moy} : taille moyenne ; Cr : taille des cristaux, Ag : taille des agrégats ; I(%) : inhibition.

Ces résultats sont représentés par des courbes sur la figure 17 pour noter l'effet du jus de citron jaune sur la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium.

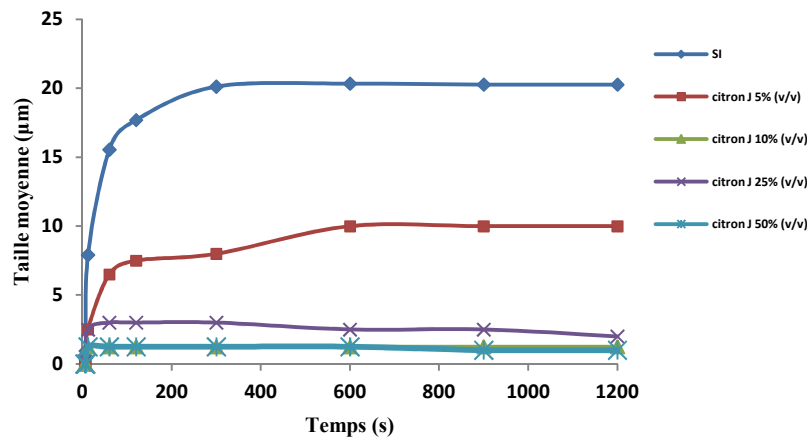


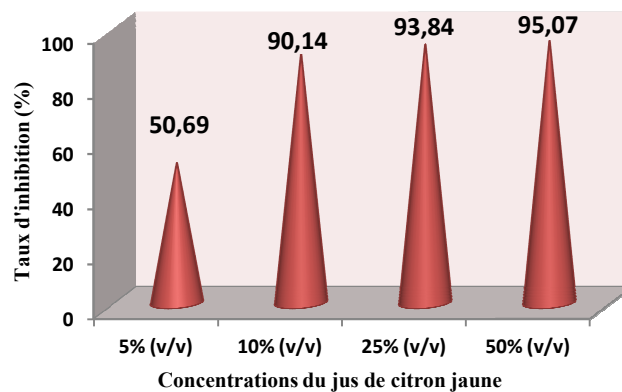
Figure 17 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus de citron jaune.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Selon les résultats regroupés dans le tableau 15, on enregistre comme pour le jus d'orange, une diminution importante des tailles dès le début des expériences pour toutes les concentrations. Le temps de germination a été de 12 s pour les concentrations étudiées au lieu de 5s qui est observé pour la cristallisation sans inhibiteur. Pour la cristallisation avec une concentration de 50% (v/v), la taille moyenne des cristaux a été réduite à 1 μm , ce qui est considérable. L'effet du citron jaune est impressionnant, on remarque qu'à partir de la concentration 25% (v/v), les agrégats ne se forment plus. La figure 17 montre l'effet du jus de citron jaune sur la diminution des tailles des cristaux.

L'histogramme 3 regroupe les taux d'inhibition du jus de citron jaune à la fin de l'expérience de la cristallisation oxalocalcique pour toutes les concentrations.



Histogramme 3: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de citron jaune.

De l'histogramme 3, on remarque des pourcentages d'inhibitions plus importants par rapport au jus d'orange. Un effet considérable a été enregistré, le taux d'inhibition a presque doublé à partir de la concentration 10% (v/v), pour atteindre 95,07% d'inhibition à la concentration de 50% (v/v).

3.2.2.2. Etude morphologique

L'étude de la cristallisation par microscopie optique à lumière polarisante a révélée la formation de weddellite, les photographies 12 et 13 des échantillons avec les concentrations respectives de 10% (v/v) et 50% (v/v) attestent les résultats.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

<p>Photographie 11: Cristallisation de l'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur à 1200 s. T_{Moy} agrégat = 29,725 μm (40x10).</p>	<p>Photographie 12 : Cristallisation en présence du jus de citron jaune 10% (v/v) à t=1200 s. T_{Moy} agrégat = 3,5 μm (40x10).</p>	<p>Photographie 13 : Cristallisation en présence du jus de citron jaune 50% (v/v) à t=1200 s. T_{Moy} cristal = 2 μm (40x10 x2,5).</p>

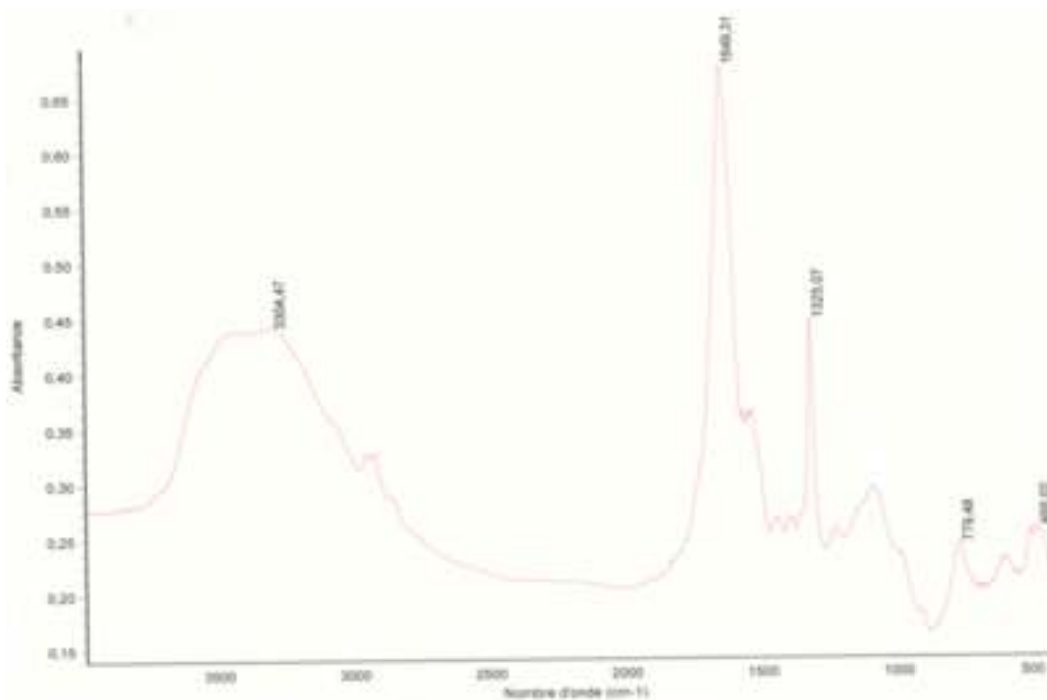
Les photographies démontrent bien l'effet positif du jus de citron jaune sur les cristaux d'oxalate de calcium monohydraté. Une conversion cristalline de la whewellite à la wheddellite est observée immédiatement avec une diminution considérable des tailles des cristaux oxalo-calciques. Pour les agrégats, elle est à la concentration 10% (v/v) de 3,5 μm . On remarque sur la photographie 13 de la concentration 50% (v/v) du jus, une diminution très importante du nombre de cristaux de wheddellite et une absence d'agrégat.

3.2.2.3. Analyse infrarouge à transformer de Fourier

Le spectre 7 réalisé sur le précipité récupéré après 1200 secondes pour la concentration 50% (v/v) du jus citron jaune, représente les bandes caractéristiques de l'oxalate de calcium dihydraté

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium



Spectre 7 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence du jus de citron jaune 50% (v/v) de composition weddellite

L'analyse spectrale du filtrat recueilli à la fin de l'expérience et son identification avec le spectre de référence 3 (chapitre II-1), montre que les cristaux formés sont des oxalates de calcium dihydraté (spectre 7). Ces résultats confirment l'étude morphologique par microscopie. Pour la concentration 50% (v/v), les bandes caractéristiques de la weddellite $1649,31 \text{ cm}^{-1}$ et $1325,07 \text{ cm}^{-1}$ remplacent celles attribuées à la whewellite ($1619,70 \text{ cm}^{-1}$ et $1317,44 \text{ cm}^{-1}$ du spectre 2) de notre urine artificielle sans inhibiteur.

3.2.3. Jus de citron vert

3.2.3.1. Analyse par microscope optique

Les tailles moyennes des cristaux et des agrégats de notre urine artificielle en présence de jus de citron vert sont regroupées sur le tableau 16. Les mesures sont faites en micromètre. Un cv inférieur ou égal à 10% en moyenne a été obtenu.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Tableau 16 : Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de citron vert à différentes concentrations pendant 1200s de cristallisation.

Temps (s)	5	7	12	60	120	300	600	900	1200	
SI	Cr (µm)	1,25	1,875	3,335	8,886	10	10,55	10,975	10,836	10,836
	Ag (µm)	0	0	12,5	22,225	25,411	29,725	29,725	29,725	29,725
	T _{Moy} (µm)	0,625	0,937	7,917	15,555	17,705	20,137	20,35	20,28	20,28
	I(%)	100	100	68,42	35,71	43,52	50,34	38,57	38,36	38,36
[CV]=5%(v/v)	Cr (µm)	0	0	1,5	5	5	5	7	7	7
	Ag (µm)	0	0	3,5	15	15	15	18	18	18
	T _{Moy} (µm)	0	0	2,5	10	10	10	12,5	12,5	12,5
	I(%)	100	100	68,42	35,71	43,52	50,34	38,57	38,36	38,36
[CV]=10%(v/v)	Cr (µm)	0	0	1,5	2	2	2,5	2,5	2,5	2,5
	Ag (µm)	0	0	3,5	4	4	5,5	5,5	5,5	5,5
	T _{Moy} (µm)	0	0	2,5	3	3	4	4	4	4
	I(%)	100	100	68,42	80,71	83,05	80,14	80,34	80,28	80,28
[CV]=25%(v/v)	Cr (µm)	0	0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T _{Moy} (µm)	0	0	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
	I(%)	100	100	84,21	91,96	92,94	93,79	93,86	93,84	93,84
[CV]=50%(v/v)	Cr (µm)	0	0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Ag (µm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T _{Moy} (µm)	0	0	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
	I(%)	100	100	84,21	91,96	92,94	93,79	93,86	93,84	93,84

CV : citron vert; SI : sans inhibiteur; T_{Moy} : taille moyenne ; Cr : taille des cristaux, Ag : taille des agrégats ; I(%) : inhibition.

La figure 18 représente les tailles moyennes des cristaux en fonction du temps pour la cristallisation oxalocalcique en présence du jus de citron vert.

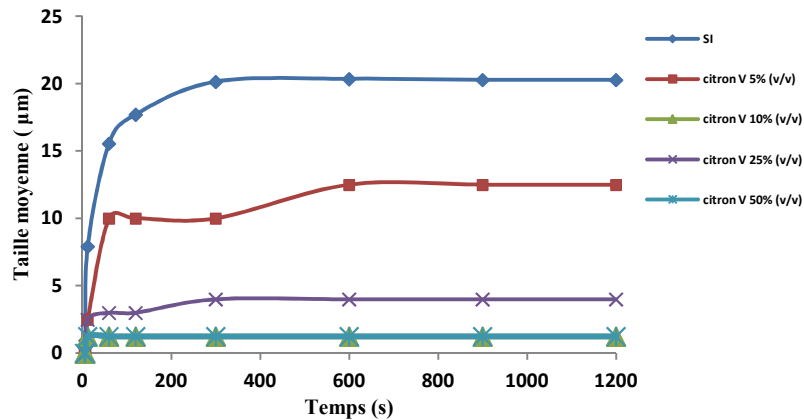


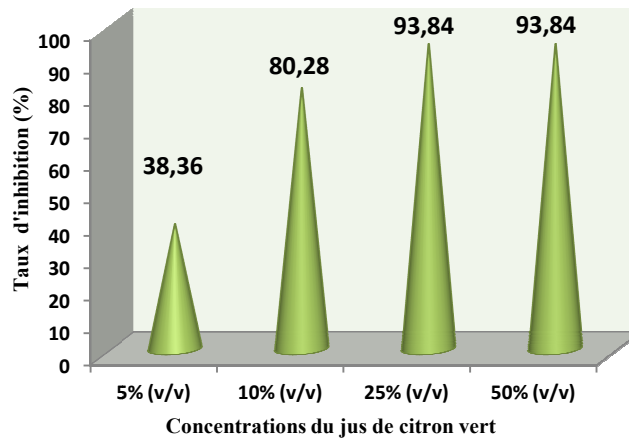
Figure 18 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus de citron vert.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

D'après les résultats illustrés sur le tableau 16, le jus de citron vert a eu le même effet que celui du citron jaune. La croissance cristalline a été ralentie pour toutes les concentrations avec des taux d'inhibition des cristaux dépassant les 35%. La formation des cristaux a commencé au temps 7 secondes au lieu de 5 secondes pour la cristallisation sans inhibiteur. Une diminution importante est enregistrée à la concentration 50% (v/v), la taille des cristaux devient 1,25 μ m à la fin de la cristallisation. Le citron vert à toutes les concentrations a eu un effet inhibiteur remarquable sur les agrégats de l'oxalate de calcium qui se traduit par la diminution de leur taille jusqu'à une disparition totale pour les concentrations 25% (v/v) et 50% (v/v). Sur la figure 18, on remarque une réduction considérable de la taille des cristaux d'oxalate de calcium en augmentant les concentrations.

L'histogramme ci-dessous relate les résultats obtenus au temps 1200 secondes pour une cristallisation en présence du jus de citron vert.



Histogramme 4: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de citron vert.

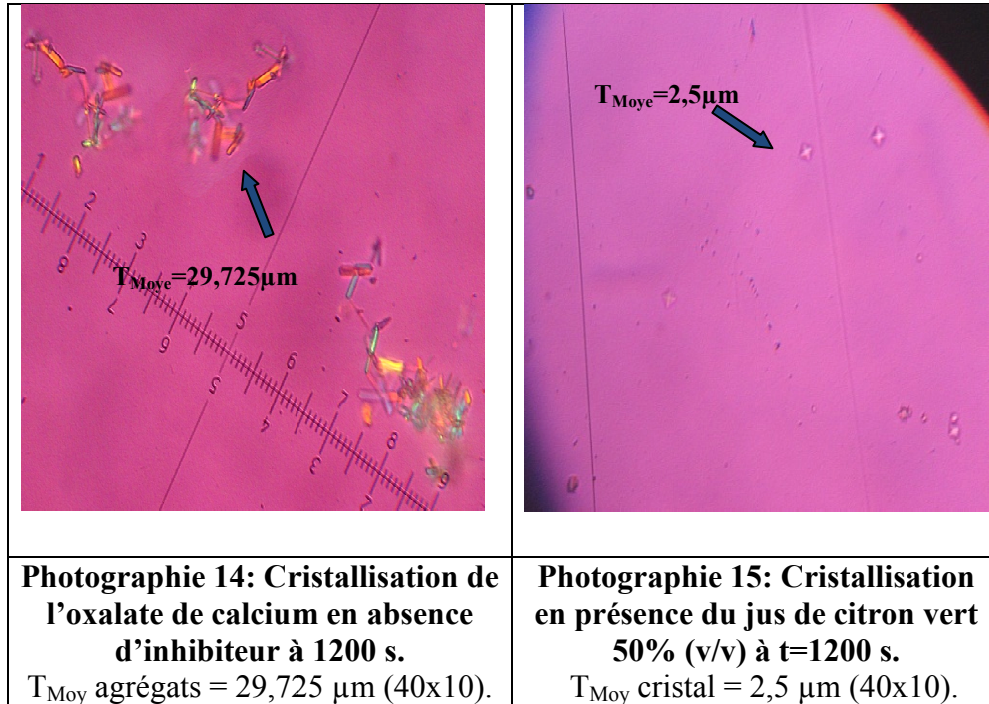
Selon l'histogramme 4, le taux d'inhibition des cristaux oxalo-calciques reste constant à partir de 25% (v/v), il est de 93,84%, ce qui démontre l'effet très important du jus de citron vert.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

3.2.3.2. Etude morphologique

La photographie 15 de l'échantillon pris au temps 1200s de la cristallisation en présence d'une concentration de 50% (v/v) du jus de citron vert, atteste l'effet du jus de citron vert sur les particules de whewellite.



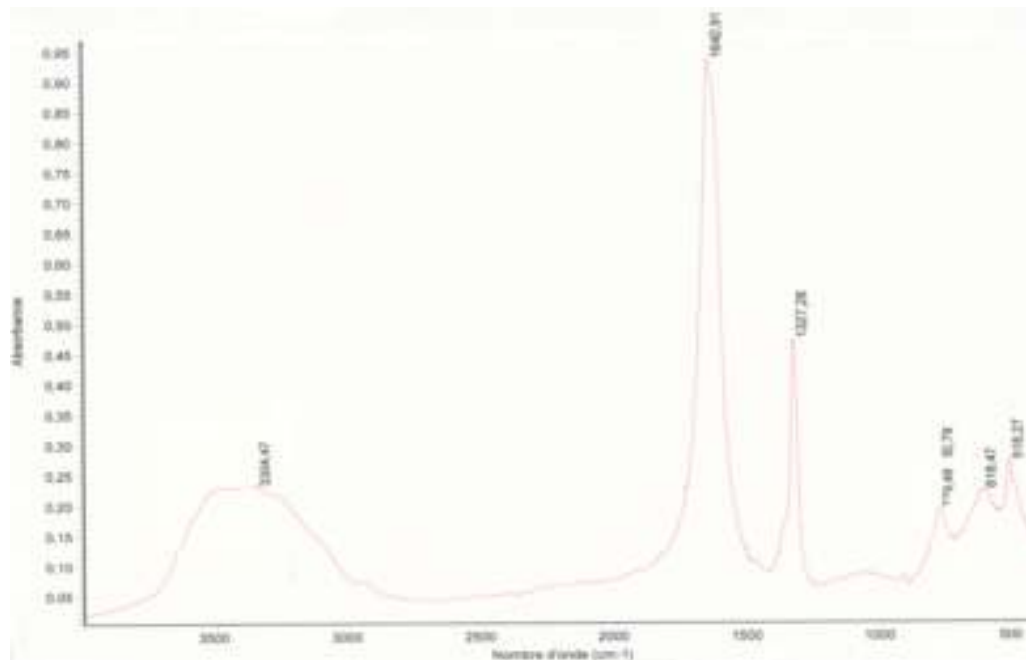
Sur la photographie 15, on remarque une conversion des cristaux de l'oxalate de calcium monohydraté en oxalate de calcium dihydraté pour une concentration de 50% (v/v) du jus de citron vert. Cet effet a provoqué une diminution du nombre de cristaux d'oxalate de calcium. Comme pour le jus de citron jaune, le citron vert a empêché la formation des agrégats à partir de la concentration de 25% (v/v). En général, le jus de citron vert a eu un très bon effet sur les cristaux d'oxalate de calcium monohydraté.

3.2.3.3. Analyse infrarouge à transformer de Fourier

Le spectre 8 est réalisé sur le culot récupéré après 1200 secondes de notre urine artificielle, en présence du jus de citron vert à la concentration 50% (v/v).

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium



Spectre 8 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence du jus de citron vert 50% (v/v) de composition weddellite

L'interprétation du spectre 8 pour la concentration 50% (v/v) du jus de citron vert, identifie les bandes caractéristiques de la weddellite suivantes :

- Bande de vibration de C=O forte à $1642,91 \text{ cm}^{-1}$ asymétrique à gauche, en biseau.
- Bande de vibration C-O moyenne, fine à $1327,28 \text{ cm}^{-1}$, asymétrique à gauche.

3.2.4. Jus de Pamplemousse

3.2.4.1. Analyse par microscope optique

Les résultats obtenus de la cinétique de cristallisation en présence du pamplemousse sont représentés sur le tableau 17. Une bonne reproductibilité et un cv inférieur ou égal à 9% ont été assurés pour toutes les concentrations.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Tableau 17: Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de pamplemousse à différentes concentrations pendant 1200s de cristallisation.

Temps (s)	5	7	12	60	120	300	600	900	1200	
SI	Cr (µm)	1,25	1,875	3,335	8,886	10	10,55	10,975	10,836	10,836
	Ag (µm)	0	0	12,5	22,225	25,411	29,725	29,725	29,725	29,725
	T _{Moy} (µm)	0,625	0,937	7,917	15,555	17,705	20,137	20,35	20,28	20,28
	I(%)	20	46,64	52,63	19,64	15,28	13,09	14	13,71	13,71
[P]=5%(v/v)	Cr (µm)	1	1	2,5	7	9	9	9	9	9
	Ag (µm)	0	0	5	18	21	26	26	26	26
	T _{Moy} (µm)	0,5	0,5	3,75	12,5	15	17,5	17,5	17,5	17,5
	I(%)	20	46,64	52,63	19,64	15,28	13,09	14	13,71	13,71
[P]=10%(v/v)	Cr (µm)	1	1	2,5	7	9	9	9	9	9
	Ag (µm)	0	0	5	18	21	26	26	26	26
	T _{Moy} (µm)	0,5	0,5	3,75	12,5	15	17,5	17,5	17,5	17,5
	I(%)	20	46,64	52,63	19,64	15,28	13,09	14	13,71	13,71
[P]=25%(v/v)	Cr (µm)	1	1	1,5	1,5	5	7	7	7	7
	Ag (µm)	0	0	3,5	3,5	12,5	18	18	18	18
	T _{Moy} (µm)	0,5	0,5	2,5	2,5	8,75	12,5	12,5	12,5	12,5
	I(%)	20	46,64	68,42	83,93	50,58	37,92	38,57	38,36	38,36
[P]=50%(v/v)	Cr (µm)	1	1	1,5	1,5	5	7	7	7	7
	Ag (µm)	0	0	3,5	3,5	12,5	18	18	18	18
	T _{Moy} (µm)	0,5	0,5	2,5	2,5	8,75	12,5	12,5	12,5	12,5
	I(%)	20	46,64	68,42	83,93	50,58	37,92	38,57	38,36	38,36

P : pamplemousse; SI : sans inhibiteur; T_{Moy} : taille moyenne ; Cr : taille des cristaux, Ag : taille des agrégats ; I(%) : inhibition.

La figure 19 illustre les résultats sous forme de courbe des tailles moyennes des cristaux en fonction du temps pour toutes les concentrations.

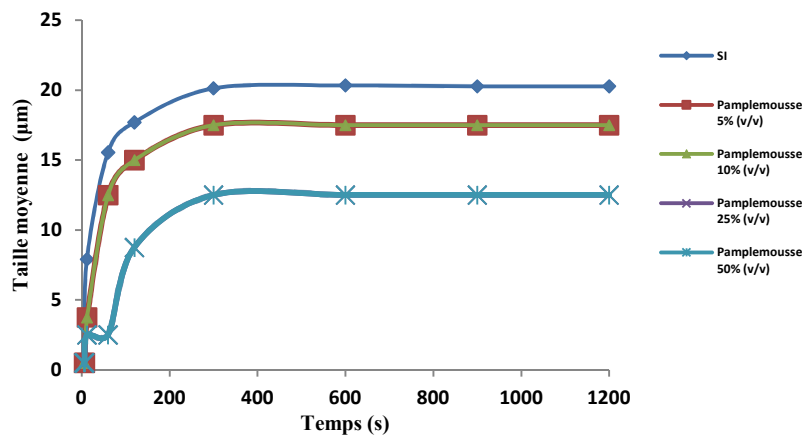


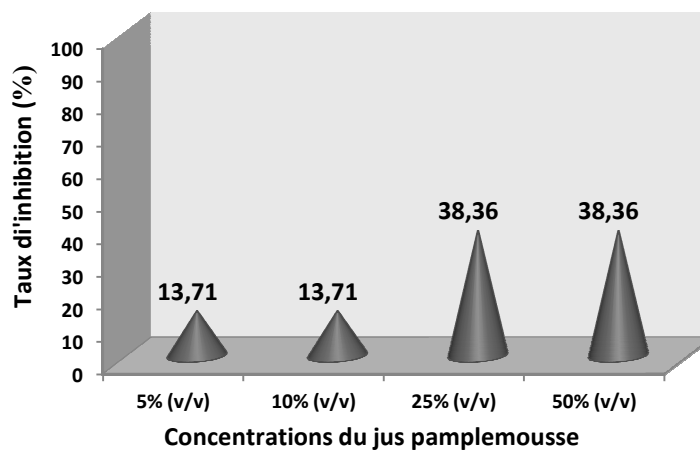
Figure 19 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence du jus de pamplemousse.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Les résultats exposés dans le tableau 17, montrent que l'utilisation du jus de pamplemousse n'a provoqué aucun changement dans le temps d'induction. Par contre, il a donné une diminution de taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium à la concentration de 50% (v/v), où la taille devient 12,5 μm , ce qui est montré sur la figure 19 par des courbes de la cinétique de l'évolution des tailles des cristaux oxalo-calciques en fonction du temps.

Le taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium par le jus de pamplemousse à différentes concentrations est repris sur l'histogramme 5 au temps 1200s.



Histogramme 5: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence du jus de pamplemousse.

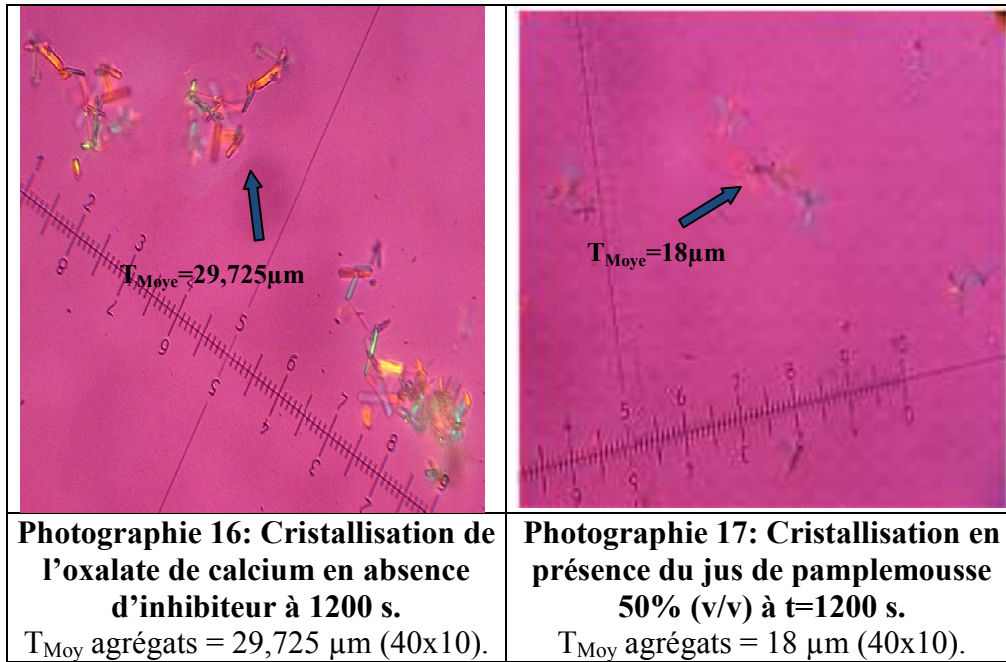
Le pamplemousse n'a pas donné de résultat satisfaisant par rapport aux autres jus. Une inhibition moyenne des cristaux d'oxalate de calcium est enregistrée à la concentration 25% (v/v) et 50% (v/v) où le pourcentage est de 38.36% à la fin de l'expérience.

3.2.4.2. Etude morphologique

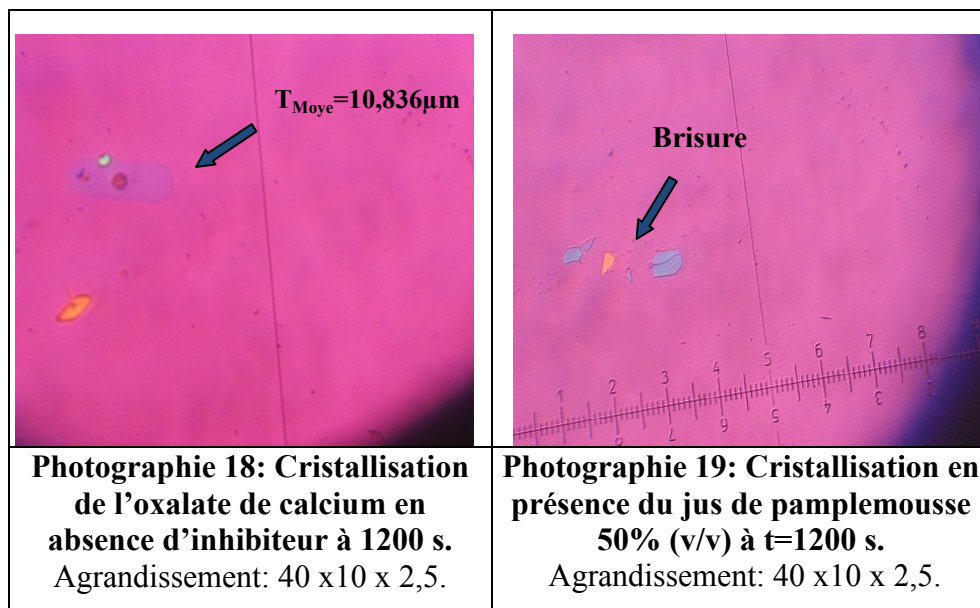
La représentation des résultats de la cristallisation en présence du jus de pamplemousse à la concentration 50% (v/v) et au temps 1200s est indiquée sur la photographie 17.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium



L'effet du jus de pamplemousse sur la surface du cristal d'oxalate de calcium à la concentration 50% (v/v).



On dénote sur la photographie 17, une diminution des tailles des agrégats d'oxalate de calcium en présence du jus de pamplemousse. On remarque que son effet sur les cristaux n'est pas important. Il n'y a pas eu de changement sur la forme des cristaux, ils sont hexagonaux,

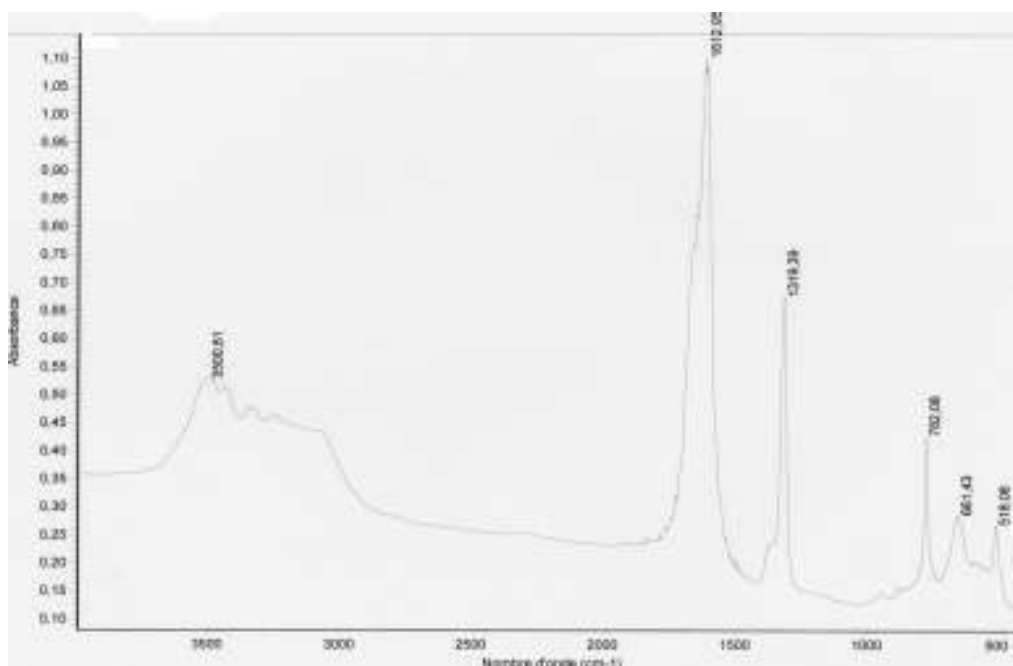
Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

rectangulaires à polarisation intense, ce qui prouve la présence de la whewellite. La photographie 19 montre que ce jus a provoqué une brisure du cristal d'oxalate de calcium monohydraté.

3.2.4.3. Analyse infrarouge à transformée de Fourier

Le spectre 9 réalisé sur le précipité récupéré, après 1200 secondes de cristallisation avec une concentration de 50% (v/v) de jus de pamplemousse est le suivant :



Spectre 9 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence du jus de pamplemousse 50% (v/v) de composition whewellite

On comparant Les fréquences du spectre 9 à ceux du spectre référence 1 (chapitre II-1) de l'oxalate de calcium monohydraté, les cristaux identifiés sont de la whewellite. Les pics obtenus sont $1612,95\text{cm}^{-1}$ et $1319,39\text{cm}^{-1}$ confirmant les résultats obtenus par l'analyse morphologique.

3.2.5. Comparaison entre les jus de fruits

À partir de la Figure 20, les effets les plus remarquables ont été constatés avec les jus de citron jaune et vert qui ont donné un taux d'inhibition important sur les cristaux d'oxalate de calcium monohydraté, suivi du jus d'orange et celui du pamplemousse. Cette inhibition reste stable à partir de la concentration 25% (v/v), elle est à la concentration de 50% (v/v) de 95,07% et 93,88% pour le citron jaune et vert respectivement. Aussi, l'effet de ces deux agrumes

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

augmente dès le début de changement des concentrations avec des pourcentages élevés. Tandis que, pour l'orange ce n'est qu'à 50% (v/v) qu'il a donné une bonne inhibition et le pamplemousse quant à lui, son effet a été moyen.

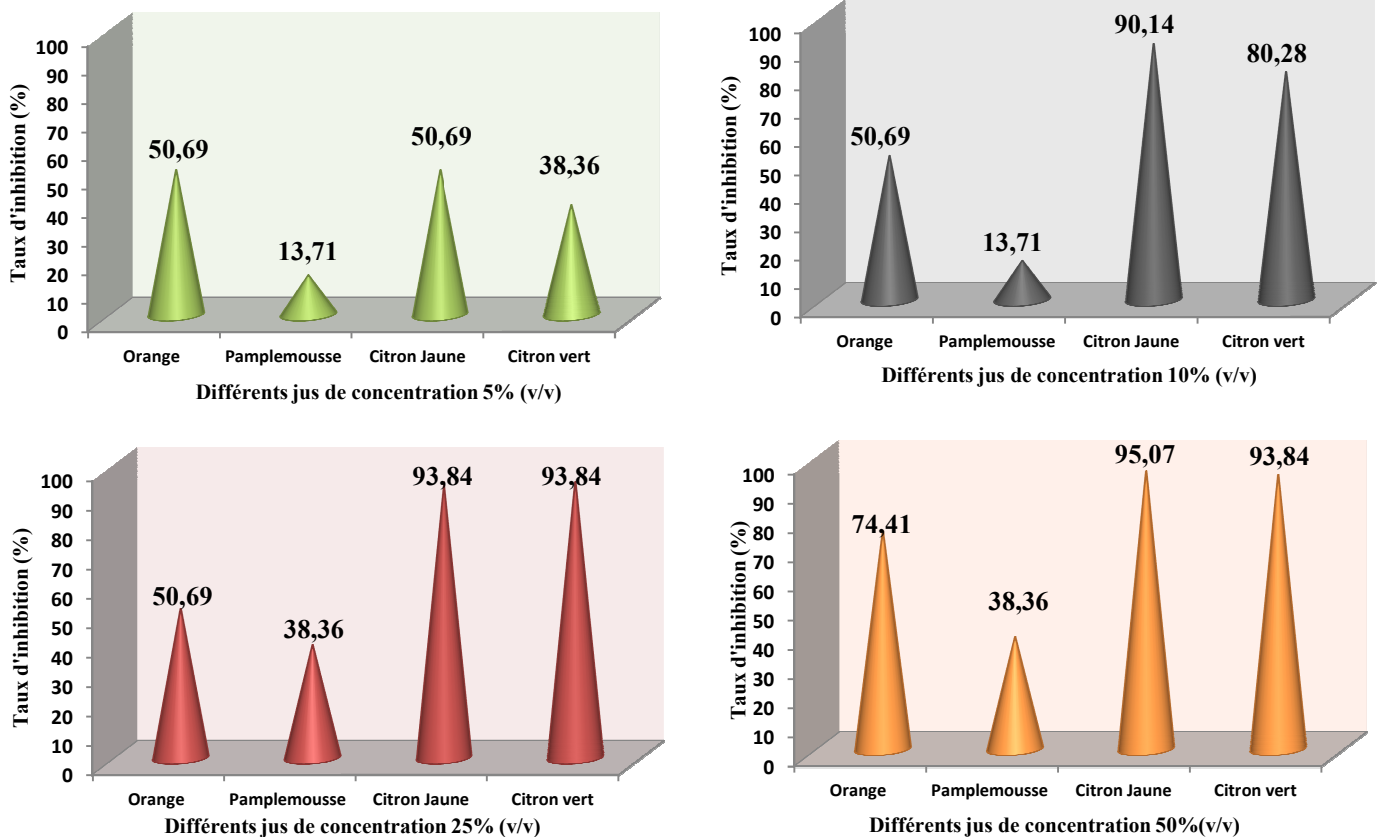


Figure 20 : Taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en fonction de différentes concentrations des jus de fruits

Pour une concentration de 25% (v/v), le taux d'acide ascorbique présent dans le jus d'orange, du citron jaune et du citron vert est de 70, 4mg/100ml, 63,4 mg/100ml et 66,9 mg/100ml respectivement (voir le tableau 12). L'inhibition pour cette concentration devient importante, surtout pour les citrons, ils ont inhibé totalement les agrégats. Pour cette même concentration, le jus de pamplemousse quant à lui a eu le moins d'effet sur les cristaux, en même temps sa concentration en acide ascorbique reste la plus faible (tableau 12).

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

3.2.6. La Vitamine C commerciale

3.2.6.1. Analyse par microscope optique

Les résultats du suivi de la cristallisation en présence de la vitamine C commerciale, par microscope optique à lumière polarisante sont regroupés dans le tableau 18. Le cv calculé est inférieur ou égal à 8% en moyenne.

Tableau 18: Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence de la vitamine C commerciale pendant 1200s de cristallisation.

Temps	(s)	5	7	12	60	120	300	600	900	1200
SI	Cr (µm)	1,25	1,875	3,335	8,886	10	10,55	10,975	10,836	10,836
	Ag (µm)	0	0	12,5	22,225	25,411	29,725	29,725	29,725	29,725
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	7,917	15,555	17,705	20,137	20,35	20,28	20,28
[VC]=0,5g/100ml	Cr (µm)	1,25	1,875	2,5	8	8	9	9	9	9
	Ag (µm)	0	0	7,7	19,2	19,2	21,2	22	22	22
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	5,1	13,6	13,6	15,1	15,5	15,5	15,5
	I(%)	0	0	35,58	12,57	23,18	25,01	23,83	23,57	23,57
[VC]=1g/100ml	Cr (µm)	1,25	1,875	2,5	8	8,78	8,78	8,78	8,78	8,78
	Ag (µm)	0	0	7,7	18	21,2	21,2	21,2	19,88	19,88
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	5,1	13	14,99	14,99	14,99	14,33	14,33
	I(%)	0	0	35,58	16,42	15,33	25,56	26,34	29,34	29,34
[VC]=1,5g/100ml	Cr (µm)	1,25	1,875	2,5	8	8,78	8,78	8,78	8,78	8,78
	Ag (µm)	0	0	7,7	18	21,2	21,2	21,2	19,88	19,88
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	5,1	13	14,99	14,99	14,99	14,33	14,33
	I(%)	0	0	35,58	16,42	15,33	25,56	26,34	29,34	29,34
[VC]=2g/100ml	Cr (µm)	1,25	1,875	2,5	8	7	8	8	8	8
	Ag (µm)	0	0	7,7	18	18	19,2	19,2	19	19
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	5,1	13	12,5	13,6	13,6	13,5	13,5
	I(%)	0	0	35,58	16,42	29,4	32,46	33,17	33,43	33,43

VC : Vitamine C commerciale; SI : sans inhibiteur; T_{Moy} : taille moyenne ; Cr : taille des cristaux, Ag : taille des agrégats ; I(%) : inhibition.

Les tailles des cristaux d'oxalate de calcium sont représentées sous forme de courbe sur la figure ci-dessous pour toutes les concentrations de la vitamine C commerciale testées.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

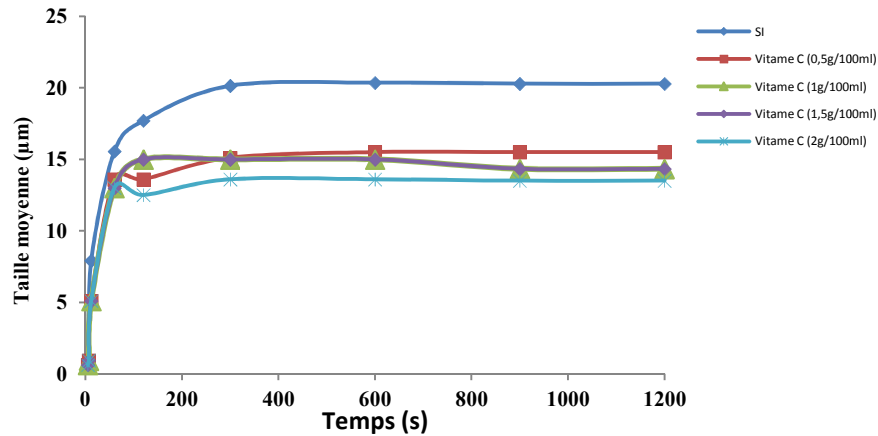
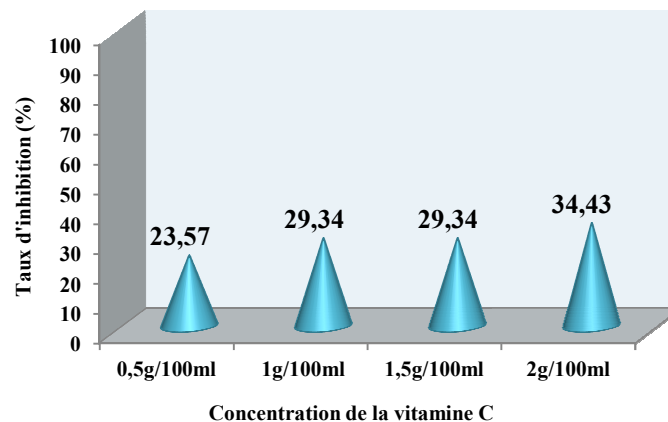


Figure 21 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence de la vitamine C commerciale.

Selon le tableau 18, la vitamine C commerciale de concentrations 0,5g/100ml, 1g/1000ml, 1,5g/100ml et 2g/100ml n'a pas donné de résultats satisfaisants. Les cristaux n'ont pas diminué de beaucoup (figure 21), aussi elle n'a pas eu d'effet sur le temps d'induction. Aucun changement sur les phases cristallines. Des les premières instants sont apparus des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté de même forme que précédemment. On remarque que la vitamine C commerciale a eu plus d'effet sur les agrégats, les tailles atteignent 19 μm à la fin de la cristallisation en présence de la vitamine C à la concentration 2g/100ml, alors qu'elles sont de 29,725 μm sans inhibiteur.

L'histogramme 6 relatant les résultats obtenus au temps 1200 secondes, pour une cristallisation en présence du de la vitamine C commerciale confirme les résultats.



Histogramme 6: Variation du taux d'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence de la vitamine C commerciale.

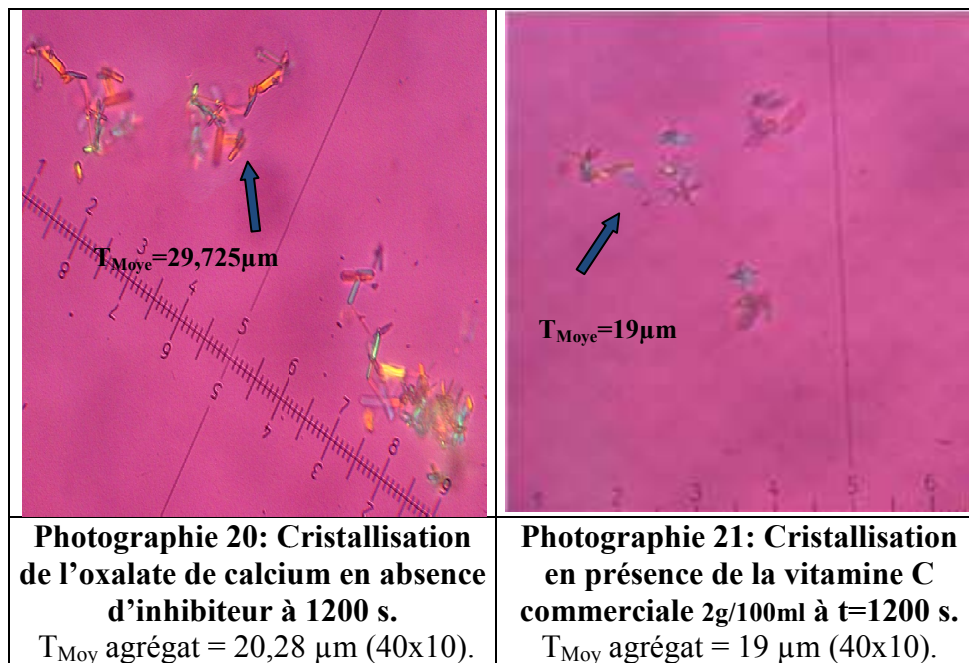
Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Sur l'histogramme 6, on dénote une légère inhibition des cristaux d'oxalate de calcium en présence de la vitamine C commerciale, le taux maximal obtenu est de 34,43% pour la concentration 2g/100ml.

3.2.6.2. Etude morphologique

La photographie ci-dessous atteste l'effet de la vitamine C commerciale sur les cristaux d'oxalate de calcium monohydraté.



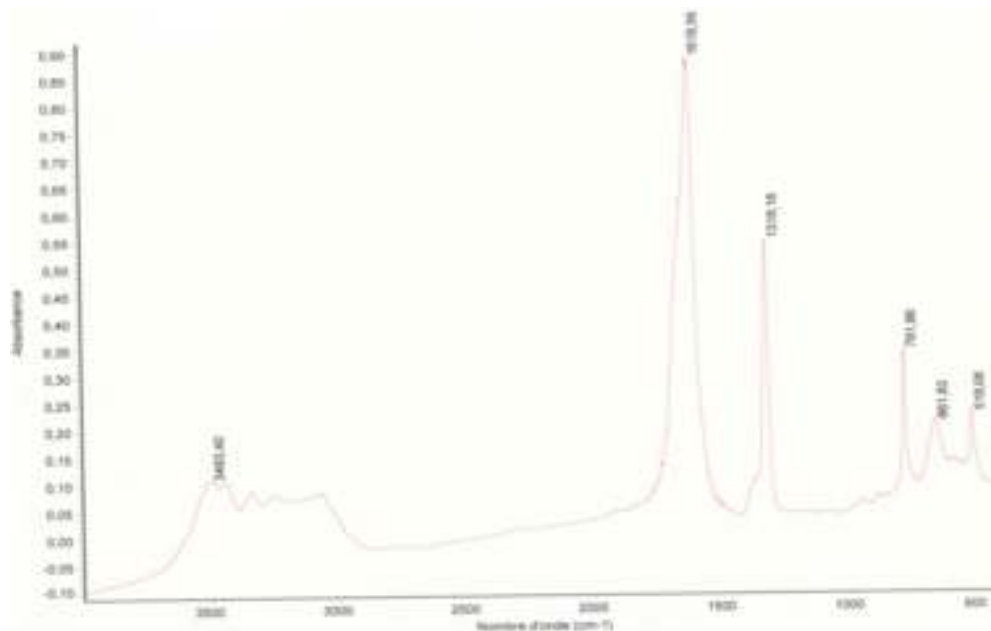
Sur la photographie 21, on remarque que le nombre de cristaux et d'agrégat reste important et leurs tailles n'ont pas diminué de beaucoup. La taille minimale obtenue est de 19µm à la concentration 2g/100ml. L'étude a montré qu'il n'y a pas de formation de cristaux de weddellite en présence de la vitamine C commerciale, la seule forme apparue a été la whewellite. On conclut que l'effet de la vitamine C commerciale n'est pas important par rapport aux jus de fruits testés.

3.2.6.3. Analyse infrarouge à transformée de Fourier

Le spectre 10 réalisé sur le culot récupéré après 1200 secondes pour la concentration 2g/100ml représente les bandes caractéristiques de l'oxalate de calcium monohydraté.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium



Spectre 10 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de la vitamine C commerciale 2g/100ml de composition whewellite

Le spectre IRTF 10 montre des bandes caractéristiques de la whewellite, comme composé principal, ce qui confirme les résultats obtenus.

Les bandes caractéristiques de la whewellite sont :

- Bande de vibration de C=O forte à $1619,56 \text{ cm}^{-1}$ asymétrique à gauche.
- Bande C-O moyenne, fine à $1318,16 \text{ cm}^{-1}$ asymétrique à gauche.
- Bande de vibrations secondaires à $518,08 \text{ cm}^{-1}$.

3.2.7. Acide ascorbique pur

3.2.7.1. Analyse par microscope optique

Les résultats de la cristallisation oxalocalcique en présence de l'acide ascorbique pur, ont été obtenus avec une bonne reproductibilité, assurant un cv inférieur ou égal à 9% en moyenne pour toutes les concentrations. Le tableau 19 regroupe les différentes tailles des cristaux et des agrégats.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Tableau 19: Evolution de la taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en présence d'acide ascorbique pur pendant 1200s de cristallisation.

Temps (s)	5	7	12	60	120	300	600	900	1200	
SI	Cr (µm)	1,25	1,875	3,335	8,886	10	10,55	10,975	10,836	10,836
	Ag (µm)	0	0	12,5	22,225	25,411	29,725	29,725	29,725	29,725
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	7,917	15,555	17,705	20,137	20,35	20,28	20,28
[AA]=0,5g/100ml	Cr (µm)	1,25	1,875	2	6	9	9,505	9,505	9,505	9,505
	Ag (µm)	0	0	5	16,5	21	25,905	25,905	25,905	25,905
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	3,5	11,25	15	17,705	17,705	17,705	17,705
	I(%)	0	0	55,79	27,67	15,28	12,08	13	12,7	12,7
[AA]=1g/100ml	Cr (µm)	1,25	1,875	2	6	9	9,505	9,505	9,505	9,505
	Ag (µm)	0	0	5	16,5	21	25,905	25,905	25,905	25,905
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	3,5	11,25	15	17,705	17,705	17,705	17,705
	I(%)	0	0	55,79	27,67	15,28	12,08	13	12,7	12,7
[AA]=1,5g/100ml	Cr (µm)	1,25	1,875	2	5	8	9	9	9	9
	Ag (µm)	0	0	5	15	19	22,5	22,5	22,5	22,5
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	3,5	10	13,5	15,75	15,75	15,75	15,75
	I(%)	0	0	55,79	35,71	23,75	21,78	22,60	22,34	22,34
[AA]=2g/100ml	Cr (µm)	1,25	1,875	2	5	8	9	9	9	9
	Ag (µm)	0	0	5	15	19	22,5	22,5	22,5	22,5
	T_{Moy}(µm)	0,625	0,937	3,5	10	13,5	15,75	15,75	15,75	15,75
	I(%)	0	0	55,79	35,71	23,75	21,78	22,60	22,34	22,34

AA : acide ascorbique; SI : sans inhibiteur; T_{Moy} : taille moyenne ; Cr : taille des cristaux, Ag : taille des agrégats ; I(%) : inhibition

La figure 22 illustre les résultats sous forme de courbe des tailles moyennes des cristaux en fonction du temps.

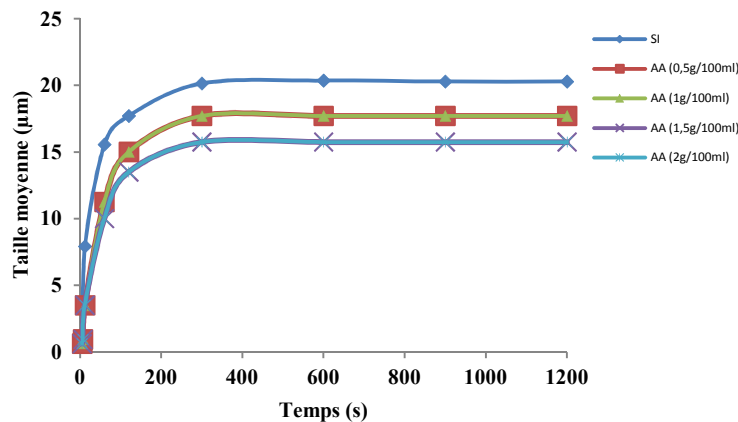


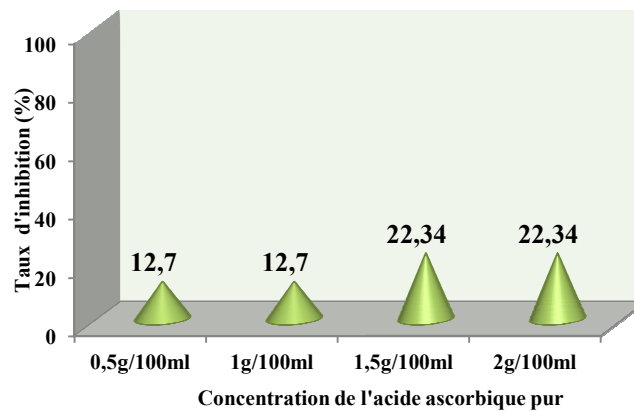
Figure 22 : Taille moyenne des cristaux d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence d'acide ascorbique pur.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

L'ajout de l'acide ascorbique pur selon le tableau 19 n'a pas décalé le temps d'induction, il a réduit la taille des cristaux d'oxalate de calcium à partir de la douzième seconde. La taille moyenne des cristaux a été de 20,28 μm (étude sans inhibiteur) pour devenir 15,75 μm au temps 1200 s en présence de l'acide à la concentration 2g/100ml., la figure 22, confirme la diminution légère des tailles des cristaux. Enfin, l'acide ascorbique n'a pas eu d'influence sur les faciès des cristaux.

Le taux d'inhibition de la cristallisation avec les différentes concentrations de l'acide ascorbique est repris sur l'histogramme 7 au temps $t=1200\text{s}$.



Histogramme 7 : Variation du taux d'inhibition en présence d'acide ascorbique pur.

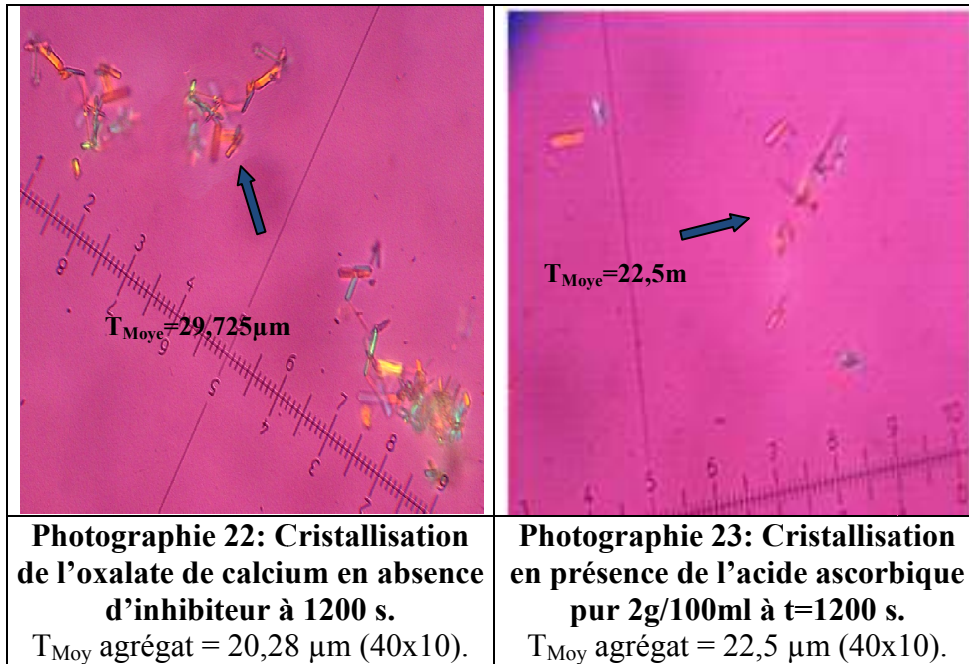
L'acide ascorbique pur n'a pas donné de résultat satisfaisant. Une faible inhibition des cristaux d'oxalate de calcium est enregistrée à la concentration 2g/100ml où le pourcentage est de 22,34%. Pour le reste des concentrations, l'acide n'a presque pas eu d'effet sur la cristallisation oxalocalcique.

3.2.7.2. Etude morphologique

La photographie 23 montre bien que l'effet d'acide ascorbique pur à la concentration 2g/100ml n'est pas important.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium



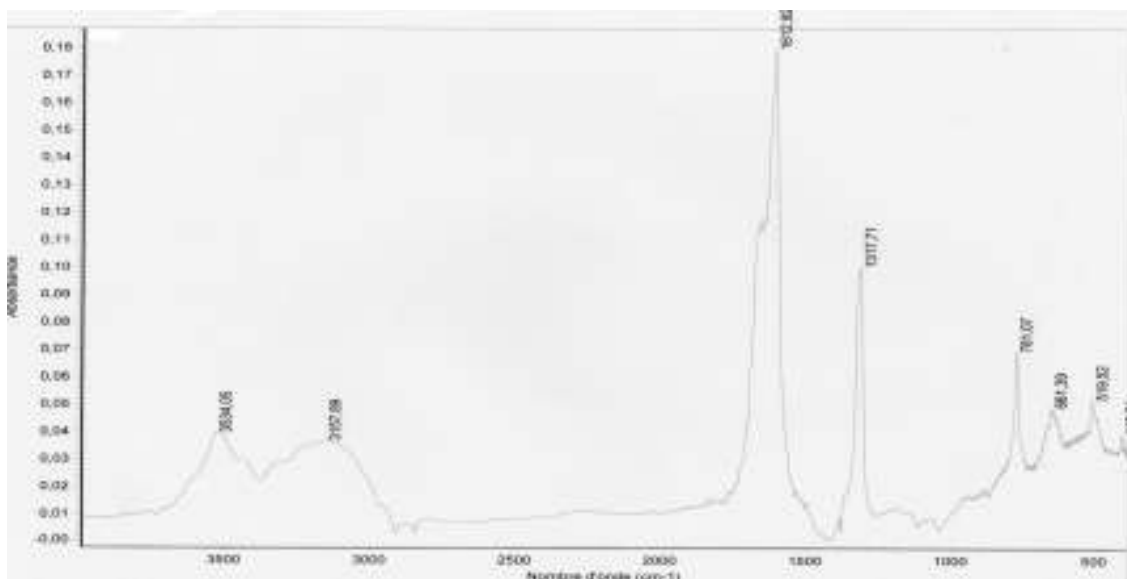
La prise de la photographie 23 à la fin de la cristallisation en présence de l'acide ascorbique de concentration 2g/100ml, confirme son effet minime sur les cristaux et les agrégats. On a obtenu de l'oxalate de calcium monohydraté avec la même forme que celle observée pour la cristallisation sans inhibiteur. On remarque les tailles des agrégats n'a pas diminué de beaucoup, elle reste toujours supérieure à 20µm.

3.2.7.3. Analyse infrarouge à transformer de Fourier

Le spectre 11 réalisé sur le précipité récupéré après 1200 secondes pour la concentration 2g/100ml de l'acide ascorbique pur, représente les bandes caractéristiques de l'oxalate de calcium monohydraté.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium



Spectre 11 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence d'acide ascorbique pur 2g/100ml de composition whewellite

Le spectre 11 réalisé pour la concentration 2g/100ml, montre que les pics obtenus représentent la whewellite.

- Bande de vibration de C=O forte à 1612,92 cm^{-1} asymétrique à gauche.
- Bande C-O moyenne, fine à 1317,71 cm^{-1} asymétrique à gauche.
- Bande de déformation H₂O hors du plan, fine à 781,07 cm^{-1} .
- Bande de vibrations secondaires à 519,52 cm^{-1} .

4. Discussion

La sursaturation de l'urine en cristaux d'oxalate de calcium, le composant le plus commun des calculs rénaux (32) est un facteur important dans la cristallisation, ainsi que les étapes germination, croissance et agrégation. Plusieurs mesures sont généralement prises pour réduire la sursaturation, comme l'alimentation saine et raisonnable et l'augmentation des apports hydrique (33, 34). Les jus de fruits font partie des aliments consommés et sont une source naturelle de vitamine C. C'est pourquoi on a déterminé la teneur en acide ascorbique de quelques agrumes choisis dans le marché local. L'étude a montré que le taux le plus élevé se trouve dans le jus d'orange, ensuite dans celui du citron jaune, puis le citron vert et enfin dans le pamplemousse.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

Les agrumes ont la même morphologie et le même développement, mais leur composition en pourcentage d'acide ascorbique est différente (30).

Les résultats obtenus sont comparables à des études réalisées sur l'estimation de la teneur en vitamine C dans ces fruits (35) et sont différents à d'autres. Généralement, la variation de la proportion de la vitamine C dans les agrumes pourrait être attribuée à de nombreux facteurs tels que la récolte et l'environnement. Aussi l'exposition à la lumière influence la composition chimique des fruits et en particulier sur la vitamine C, plus les agrumes sont exposés à la lumière, plus la teneur en vitamine C est élevée (36). Egalement la température est importante dans le maintien de la vitamine C contenu dans les fruits. Aussi, le processus de maturation des agrumes pourrait réduire le taux d'acide ascorbique. Igwe et al (30) ont montré que la concentration en vitamine C des fruits non mûrs est plus élevée que ceux qui sont mûrs.

La responsabilité lithogène de l'acide ascorbique n'a pas été prouvée. Une étude faite par Curhan et al (28), a démontré qu'une consommation régulière et à long terme de 2 g et plus par jour d'acide ascorbique n'a pas été associée à un risque plus élevé de présence de calculs rénaux; par contre, d'autres études ont trouvés une hyperoxallurie lorsque la consommation dépasse 2g/jour (37, 38). Une étude (39) a démontré que la consommation de fruits et légumes pourrait être utile comme mesure préventive contre la formation des calculs rénaux.

Notre étude a porté sur l'effet des jus de fruits riches en vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium. On a remarqué un décalage du temps d'induction, comme il a été découvert par turbidimétrie (40), surtout pour les jus de citron jaune et vert et celui de l'orange. La capacité des jus pour réduire le temps de nucléation augmente la limite métastable de l'oxalate dans l'urine et empêche la précipitation des inhibiteurs physiologiques de la lithiase urinaire oxalocalcique (41). Selon les résultats obtenus, l'effet des jus sur la croissance et l'agrégation des particules d'oxalate de calcium monohydraté se produit pour toutes les concentrations. La taille moyenne des cristaux a été réduite considérablement en présence de jus de citron vert et jaune avec une augmentation d'inhibition à partir de la concentration de 10% (v/v), elle devient supérieure à 90%. Tandis que pour l'orange et le pamplemousse, l'inhibition la plus élevée a été à la concentration 50% (v/v) mais qui reste bien plus faible que celle du citron. Elle est de 74,41% pour le jus d'orange et 38,36% pour le jus de pamplemousse. Ces résultats sont en concordance avec l'étude faite par turbidimétrie (40), avec des taux de réduction de : 98,9% pour le jus citron-

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

vert, 95% pour le jus citron-jaune et 67,7% pour le jus d'orange. L'effet le plus considérable est la disparition des agrégats à la concentration 25% (v/v) et 50% (v/v) du jus de citron vert et jaune. L'étude faite par Touhami et coll (42), suggère après avoir administré par voie orale du jus de citron à des rats lithiasiques en oxalate de calcium, que ce dernier a une activité protectrice contre la lithiase urinaire.

L'inhibition des cristaux de whewellite par la vitamine C commerciale et l'acide ascorbique pur n'a pas donné les résultats attendus, ce qui peut suggérer que la réduction des tailles en présence des jus de fruit est probablement due à l'existence d'autres substances telles que l'acide citrique, l'acide tartrique, le magnésium, décrits comme inhibiteurs de formation et de croissance des cristaux dans l'urine. Des auteurs (43) ont montré que l'acide citrique est capable de complexer les ions calcium et d'abaisser leur quantité disponible pour réagir avec les oxalates. Il peut aussi se fixer sur la surface des cristaux pour réduire leurs tailles et modifier leur forme (44).

L'inhibition des particules d'oxalate de calcium en présence des jus peut être la conséquence d'une modification de phase cristalline d'oxalate de calcium monohydraté en oxalate de calcium dihydraté. Selon des études réalisées (45, 46), il a été démontré que les cristaux de wheddellite sont moins liés aux cellules épithéliales que sont les cristaux de whewellite. De plus, les cristaux de wheddellite obtenus sont de tailles inférieures, ce qui réduit leur chance d'être retenus dans les voies urinaires. Ces propriétés peuvent être importantes dans la prévention de la formation du calcul oxalocalique. Enfin, le pH n'a pas d'influence sur la réduction de la taille des cristaux, cela peut être expliqué par le fait que les oxalates de calcium sont de pH indépendants (47).

Pour ce premier travail, on a conclu que l'effet du jus de citron et celui de *Nigella sativa* ont été remarquable sur les cristaux d'oxalate de calcium. C'est pourquoi on a choisi pour le prochain chapitre de les tester sur des agrégats d'oxalate de calcium de grande taille.

Références bibliographiques

1. Izuagie A, Izuagie F. Iodimetric determination of ascorbic acid (Vitamin C) in citrus fruits. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 2007;3(5):367-9.
2. Suntornsuk L, Gritsanapun W, Nilkamhank S, Paochom A. Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2002;28(5):849-55.
3. Antonelli M, D'ascenzo G, Laganà A, Pusceddu P. Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination. *Talanta*. 2002;58(5):961-7.
4. Kumar GV, Ajay Kumar K, Raghu PG, Manjappa S. Determination of vitamin C in some fruits and vegetables in Davanagere city,(Karanataka)-India. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 2013;4(3).
5. Lee SK, Kader AA. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest biology and technology*. 2000;20(3):207-20.
6. Tyagi G, Jangir DK, Singh P, Mehrotra R, Ganesan R, Gopal E. Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks. *Journal of food science and technology*. 2014;51(3):476-84.
7. Rekha C, Poornima G, Manasa M, Abhipsa V, Devi JP, Kumar V, et al. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions*. 2012;1(2):303-10.
8. Cioroi M. Study on L-ascorbic acid contents from exotic fruits. *Cercetari Agronomice Moldova*. 2007;1(129):23-7.
9. Hetey S, Kleinberg M, Parker W, Johnson E. Effect of ascorbic acid on urine pH in patients with injured spinal cords. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 1980;37(2):235-7.
10. McDonald D, Murphy G. Bacteriostatic and acidifying effects of methionine, hydrolyzed casein and ascorbic acid on the urine. *New England Journal of Medicine*. 1959;261(16):803-5.
11. Travis LB, Dodge WF, Mintz AA, Assemi M. Urinary acidification with ascorbic acid. *The Journal of Pediatrics*. 1965;67(6):1176-8.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

12. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999;10(4):840-5.
13. Chalmers A, Cowley D, Brown J. A possible etiological role for ascorbate in calculi formation. *Clinical chemistry*. 1986;32(2):333-6.
14. Castello T, Girona L, Gomez M, Mur AM, Garcia L. The possible value of ascorbic acid as a prophylactic agent for urinary tract infection. *Spinal Cord*. 1996;34(10):592.
15. Parivar F, Low RK, Stoller ML. The influence of diet on urinary stone disease. *The Journal of urology*. 1996;155(2):432-40.
16. Nweze C, Abdulganiyu M, Erhabor O. Comparative analysis of vitamin C in fresh fruits juice of *Malus domestica*, *Citrus sinensi*, *Ananas comosus* and *Citrullus lanatus* by iodometric titration. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2015;4(1):17-22.
17. Iwase H. Use of nucleic acids in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 2000;881(1-2):327-30.
18. Borowski J, Szajdek A, Borowska EJ, Ciska E, Zieliński H. Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *European Food Research and Technology*. 2008;226(3):459-65.
19. Mussa SB, Sharaa I. Analysis of vitamin C (ascorbic acid) contents packed fruit juice by UV-spectrophotometry and redox titration methods. *IOSR Journal of Applied Physics*. 2014;6(5):46-52.
20. Zykova E, Ostrovskii O, Zaitsev V, Dudchenko G. Optimization of the spectrophotometric method for quantitative determination of ascorbic acid in medicinal forms. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2009;43(6):357-9.
21. Sweetman S, Strain J, McKelvey-Martin V. Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells. 1997.
22. Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans—. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;69(6):1086-107.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

23. Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V, et al. (R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *The FASEB Journal*. 1999;13(2):411-8.
24. Tadese A, Subramanian P, Woldu A, Pal R. Electrochemical determination and comparison of ascorbic acid in freshly prepared and bottled fruit juices: A cyclic voltammetric study. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2014;6(5):880-8.
25. Njoku P, Ayuk A, Okoye C. Temperature effects on vitamin C content in citrus fruits. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2011;10(12):1168-9.
26. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(8):3704-9.
27. Weber P, Bendich A, Schalch W. Vitamin C and human health--a review of recent data relevant to human requirements. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin-und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 1996;66(1):19-30.
28. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A prospective study of the intake of vitamins C and B6, and the risk of kidney stones in men. *The Journal of urology*. 1996;155(6):1847-51.
29. Jungers P, Daudon M, Le Duc A. *Epidémiologie de la lithiase urinaire. Lithiase urinaire Paris: Flammarion médecine-sciences*. 1989:1-34.
30. Igwe OU. Quantitative estimation of ascorbic acid levels in citrus fruits at variable temperatures and physicochemical properties. *International Journal of Chemical and Biochemical Science*. 2014;5:67-71.
31. Bekele DA, Geleta GS. Iodometric determination of the Ascorbic acid (Vitamin C) content of some fruits consumed in Jimma town community in Ethiopia. *Research Journal of Chemical Sciences*. 2015;5(1):60-3.
32. Khan SR. Structure and development of calcific urinary stones. *Calcification in biological systems: CRC Press Inc., Boca Raton; 1992. p. 345-63*.
33. Hess B. Nierensteine--ist die Ernährung Trigger oder Therapeutikum. *Ther Umschau*. 2000;57:138-45.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium
Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

34. Patel P, Nayak N, Patel H, Patel M, Saralai M, Gandhi T. Inhibition of calcium oxalate crystallization by the fruit extracts of *Solanum Xanthocarpum* Schaad and *Wendl* and *Pedaliom murex* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2010;2(4):46-52.
35. Tareen H, Ahmed S, Mengal F, Masood Z, Bibi S, Mengal R, et al., editors. Estimation of Vitamin C Content in Artificially Packed Juices of Two Commercially Attracted Companies in Relation to Their Significance for Human Health. *Biological Forum*; 2015: Research Trend.
36. Stumpf W, Conn PM, Preiss J. *The biochemistry of plants: Carbohydrates*: Academic Press; 2012.
37. Urivetzky M, Kessaris D, Smith AD. Ascorbic acid overdosing: a risk factor for calcium oxalate nephrolithiasis. *The Journal of urology*. 1992;147(5):1215-8.
38. Wandzilak TR, D'andre SD, Davis PA, Williams HE. Effect of high dose vitamin C on urinary oxalate levels. *The Journal of urology*. 1994;151(4):834-7.
39. Meschi T, Maggiore U, Fiaccadori E, Schianchi T, Bosi S, Adorni G, et al. The effect of fruits and vegetables on urinary stone risk factors. *Kidney international*. 2004;66(6):2402-10.
40. Messaoudi N. Etude de l'inhibition chimique et naturelle dans la cristallisation phosphocalcique à pH= 6, 5 et 8 2016. Thèse de doctorat.
41. Atmani F, Khan S. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Bju International*. 2000;85(6):621-5.
42. Touhami M, Laroubi A, Elhabazi K, Loubna F, Zrara I, Eljahiri Y, et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. *BMC urology*. 2007;7(1):18.
43. Purich D, Antinozzi P, Brown C. Inhibitory action of citrate on calcium oxalate monohydrate crystal nucleation and growth. *Urolithiasis 2*: Springer; 1994. p. 155-8.
44. Daudon M, Hennequin C, Bader C, Jungers P, Lacour B, Druke T. Inhibiteurs de cristallisation dans l'urine. *Actualités néphrologiques Jean Hamburger*. 1994:165-220.
45. Wesson JA, Worcester EM, Wiessner JH, Mandel NS, Kleinman JG. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney international*. 1998;53(4):952-7.
46. Atmani F, Farrell G, Lieske JC. Extract from *Herniaria hirsuta* coats calcium oxalate monohydrate crystals and blocks their adhesion to renal epithelial cells. *The Journal of urology*. 2004;172(4):1510-4.

Chapitre II : Inhibition des cristaux d'oxalate de calcium

Partie 2 : L'effet inhibiteur des jus de fruits et de la vitamine C sur les cristaux d'oxalate de calcium

47. Daudon M, Jungers P, Lacour B, editors. Clinical value of crystalluria study. Annales de biologie clinique; 2004.

Chapitre III

Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

1. Introduction

Les conditions socio-économiques génèrent des changements dans l'incidence, la localisation et la composition de la lithiase (1). La cristallisation oxalocalcique commence par la sursaturation, suivie de la nucléation, la croissance et enfin l'agrégation. Cette dernière conduit au regroupement des cristaux en particules plus volumineuses et donc peut constituer un facteur de risque important dans la lithiase urinaire. C'est un des mécanismes majeurs qui causent la formation du calcul (2-5). Notre travail est basé sur cette phase, en mettant au point un modèle d'agrégation d'oxalate de calcium *in vitro* avec comme condition l'obtention d'agrégats de grandes tailles. C'est pourquoi on a varié les concentrations du chlorure de calcium dihydraté et de l'oxalate de sodium anhydre pour obtenir l'urine artificielle expérimentée dans notre étude. Le rapport molaire calcium/oxalate détermine le mode de cristallisation. La formation des cristaux de weddellites est propice par une hypercalciurie et les cristaux de whewellite sont développés par une hyperoxalurie (6-13).

Les ressources naturelles sont des sources d'aliments nécessaires aux besoins des êtres humains. L'alimentation est d'une importance vitale pour l'humanité. Sur le plan nutritionnel, on y retrouve des aliments qui peuvent être considérés comme promoteurs de la lithiase et d'autres qui peuvent contenir des substances inhibitrices de la cristallisation oxalocalcique. On s'est intéressée à cette richesse naturelle pour évaluer l'effet de quelques substances naturelles sur des agrégats d'oxalate de calcium de grande taille, formés par notre modèle de cristallisation *in-vitro*. Trois substances souvent employées par la population ont été testées: le citron jaune, la *Nigella sativa* et le vinaigre de table.

2. Matériel et méthodes

2.1. Préparation du vinaigre et du jus de citron

Pour cette étude, on a choisi le jus de citron jaune pour son bon effet sur les cristaux d'oxalate de calcium et le vinaigre de raisin pour son utilisation quotidienne, les deux substances

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

contiennent de l'acide citrique. Pour le jus de citron, on a utilisé le même protocole de préparation des jus de fruits du chapitre II-2 et le vinaigre est acheté au marché local de Mostaganem. Des concentrations de 5% (v/v), 10% (v/v), 25% (v/v) et 50% (v/v) ont été préparées pour les deux substances.

2.2. Préparation de la Plante

Pour ses bons résultats obtenus sur les cristaux d'oxalate de calcium, on a choisi *Nigella sativa* en extrait d'infusion pour la testée sur les agrégats oxalocalciques de grande taille.

Mode de préparation :

La formule d'extraction aqueuse consiste à verser 100ml d'eau distillée bouillante sur une quantité de 2g (14) et de 4g de *Nigella*. Le temps de repos de la plante dans l'eau est de 15 minutes (15).

2.3. Agrégation de l'oxalate de calcium

La cristallisation oxalocalcique est un mélange de deux solutions $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (Biochem) et $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (Biochem), de même volume chacun introduit dans un erlenmeyer et placé dans un bain-marie thermostaté à 37 °C. Les solutions sont préparées à partir d'une solution de chlorure de sodium (Prolabo) de 9 g/l pour maintenir la force ionique constante de 0,15 M. le but est de former des agrégats de grande taille en variant la concentration de l'oxalate et du calcium de l'urine. Pour cela, soit on a changé les concentrations de bases de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, soit on a ajouté des solutions ou des masses (gramme) des deux substances dans notre milieu réactionnel, soit on a additionné des urines lithiasiques diluées présentant des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté dans notre urine artificielle. Une fois le mélange effectué, des prélèvements ont été pris à différents temps et observés sous microscope optique à lumière polarisée. L'analyse consiste à mesurer la plus grande taille (T_{Max}) moyenne des agrégats et à prendre des photographies à l'aide d'un appareil photo numérique. Une fois l'agrégat de grande taille choisi, on a filtré la solution pour récupérer le précipité afin d'être séché puis analysé par infrarouge à transformée de Fourier pour déterminer l'espèce.

Les tailles des agrégats mesurées permettent de calculer le taux de dissolution (**D%**) et sa formule est la suivante (16) :

$$D\% = \left(1 - \frac{T_A}{T_0}\right) \times 100 \quad (6)$$

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

T_A : Taille des agrégats en présence de substance naturelle à l'instant t;

T_0 : Taille des agrégats au temps t égale à zéro.

Les expériences ont été répétées 3 fois, ce nombre d'essais permet d'estimer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (cv).

Les concentrations respectives du calcium et de l'oxalate au sein du mélange ont été variées pour obtenir l'agrégat le plus grand, pour cela, plusieurs expériences ont été réalisées :

2.3.1. Protocole 1

Des solutions filles de calcium à 4 mmol/l et d'oxalate à 1 mmol/l. ont été préparées à partir des solutions mères de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 40 mmol/l et de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 4 mmol/l. Les procédures de travail sont décrites ci-dessous :

- **Expérience 1** : une fois les solutions 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 100 ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l) ont été mélangées, on a déclenché le chronomètre.
- **Expérience 2** : trois expériences ont été réalisées, où après 15 min de chaque cristallisation des solutions précédentes (expérience 1), on a ajouté à chacune d'elles une solution d'oxalate de concentration différente A, B et C. Le temps zéro a été considéré au moment de l'ajout de ces dernières.

Les solutions d'oxalate ajoutées :

- Une solution A : 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 1 mmol/l ;
- Une solution B : 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 4 mmol/l ;
- Une solution C : 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 16 mmol/l.

2.3.2. Protocole 2

- **Expérience 1** : le protocole décrit précédemment a été adapté pour une cristallisation de 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) mélangée à 150 ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l). Le déclenchement du chronomètre a été fait une fois les solutions mélangées.
- **Expérience 2** : on a ajouté à notre milieu réactionnel précédent (expérience 1 du protocole 2) :
 - une première expérience : on a ajouté après 15 min (considéré $t=0\text{min}$) de la cristallisation, 0,588 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

-une deuxième expérience : on a ajouté après 15 min (considéré $t=0$ min) de la cristallisation, 0,268 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

-une troisième expérience : on a ajouté 1,126 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à $t=0$ s de la cristallisation et après 15 min, on a ajouté la masse de 4,704 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$.

2.3.3. Protocole 3

- **Expérience 1** : on a mélangé 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) avec 100 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l). On a déclenché le chronomètre une fois les solutions mélangées.
- **Expérience 2** : on a ajouté au milieu réactionnel de la première expérience :

-une fois la solution D : 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 4 mmol/l ;

Après 15 minute de la cristallisation précédente, on a introduit la solution D.

-une fois la solution E : une urine lithiasique diluée à 10% (v/v);

-Une fois la solution F : une urine lithiasique diluée à 20% (v/v).

L'urine a été ajoutée au moment du mélange des solutions $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) et $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$. Elle provient d'un sujet lithiasique âgé de 45 ans, de sexe féminin, dont la cristallurie est positive, avec présence de cristaux de whewellite et le calcul récupéré est de type Ia, qui dévoile une hyperoxalurie.

2.3.4. Protocole 4

- On a mélangé 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 10 mmol/l avec 150 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 40 mmol/l ;

- On a mélangé 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 4 mmol/l avec 150 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 10 mmol/l.

Dans les deux cas, on a déclenché le chronomètre une fois les solutions mélangées.

2.4. Dissolution des agrégats de l'oxalate de calcium

Cette étude a été réalisée avec les mêmes conditions (température, force ionique et agitation) qu'auparavant. Quatre concentrations volumiques du vinaigre et du citron ont été testées : 5% (v/v), 10% (v/v), 25% (v/v) et 50% (v/v) sur les agrégats d'oxalate de calcium après les avoir choisis comme modèles. La plante a été préparée par le mode de préparation le plus utilisé par la population locale, à savoir l'infusion avec des concentrations de 2g/100ml et 4g/100ml.

3. Résultats

3.1. Agrégation de l'oxalate de calcium

3.1.1. Protocole 1

3.1.1.1. Expérience 1

✓ Mélange 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) avec 100 ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l)

- Analyse par microscope optique

La taille des plus grands agrégats de notre urine artificielle a été mesurée grâce à un micromètre adapté au microscope optique à lumière polarisée. Les résultats sont regroupés sur le tableau 20. La reproductibilité de nos résultats a permis d'avoir un cv inférieur ou égal à 10% en moyenne.

Tableau 20 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation de 100ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 100ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).

Temps (min)	0	0,1	0,2	1	5	10	15	20	30	60	90
Taille maximale des agrégats (μm)	0	9	16,5	28,5	49,5	51,5	51,9	52	52	55,9	55,9

La figure 23, reporte la cinétique de la taille maximale (μm) des agrégats en fonction du temps de cristallisation (min).

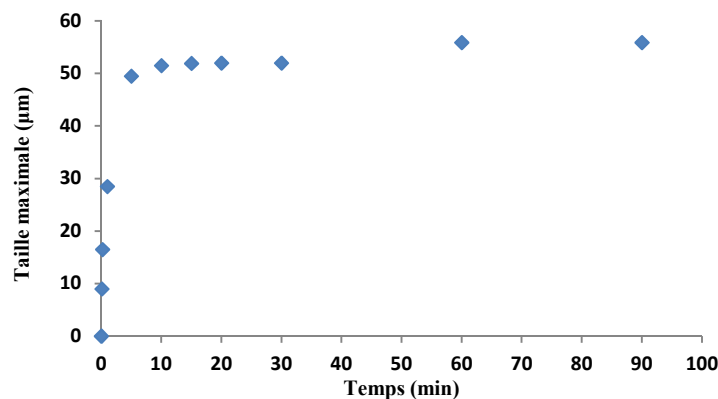


Figure 23 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps de la cristallisation de 100ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 100ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).

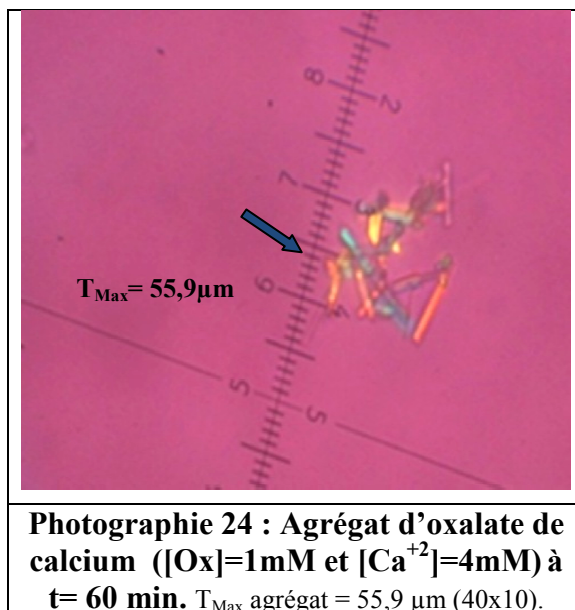
D'après les résultats du tableau 20, la taille maximale des agrégats obtenue de notre cinétique est de 55,9 μm , elle s'est stabilisée à partir de soixante minutes. Cette valeur est

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

acceptable, mais pas utile pour notre étude sur la dissolution des agrégats de grande taille. C'est résultats sont représentés sur la figure 23.

- **Etude morphologique**

La représentation des agrégats du mélange 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 100 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l) est indiquée sur la photographie ci-dessous après 60 min de cristallisation oxalocalcique *in-vitro*.



Durant l'étude de la cinétique de la cristallisation, on a observé par microscopie optique à lumière polarisante la formation d'agrégats oxalocalciques de taille maximale moyenne de $55,9 \mu\text{m}$. La photographie 24 a été prise in-situ à $t = 60$ min.

3.1.1.2. Expérience 2

✓ En ajoutant une solution de 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 1 mmol/l, à 4 mmol/l et 16 mmol/l

- **Analyse par microscope optique**

Les résultats de la cristallisation oxalocalcique après addition de $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 1\text{mM}$, $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 4\text{mM}$ et $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 16\text{mM}$ ont été obtenus avec une bonne reproductibilité, assurant un cv inférieur ou égal à 9% en moyenne. Le tableau 21 regroupe les différentes tailles.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Tableau 21 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation en ajoutant 1mM, 4 mM et 16 mM de Na₂C₂O₄.

Temps (min)		0	1	5	10	15	20	25	35	40	60	90
Taille maximale des agrégats (µm)	[Na ₂ C ₂ O ₄] = 1mM	51,9	42	31,2	34,3	33,7	33,7	33,7	33,7	33,7	38	36
	[Na ₂ C ₂ O ₄] = 4mM	51,9	43,1	39,3	41,8	41,8	41,8	38,7	38,2	41,2	39	38
	[Na ₂ C ₂ O ₄] = 16mM	51,9	45	47,5	47,5	47,5	43,1	43,1	40	40	38	40

La figure 24 représente la variation de la taille moyenne des agrégats en fonction du temps pour les trois concentrations de Na₂C₂O₄.

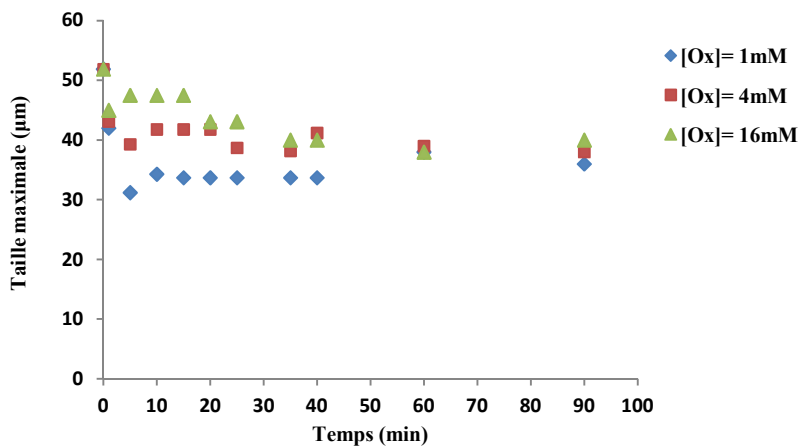
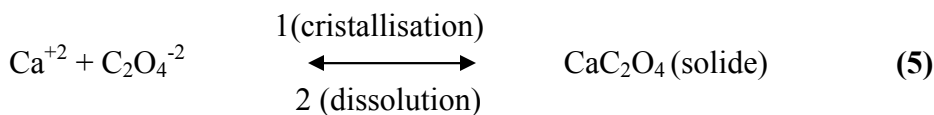


Figure 24 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 1mM, 4 mM et 16 mM de Na₂C₂O₄.

Sur la figure 24, on enregistre une diminution inattendue des tailles des agrégats pour les trois sursaturations en oxalate de sodium, ce qui est confirmé par le tableau 21. Ce résultat laisse à supposer qu'une partie des agrégats a subi une dissolution et que l'équilibre de la cristallisation s'est déplacé vers le sens inverse et au lieu d'avoir une cristallisation, on a obtenu une dissolution de ces derniers suivis d'une augmentation de leur taille. Ce qui implique que l'équilibre s'est déplacé de nouveau vers la droite où la cristallisation est favorisée.

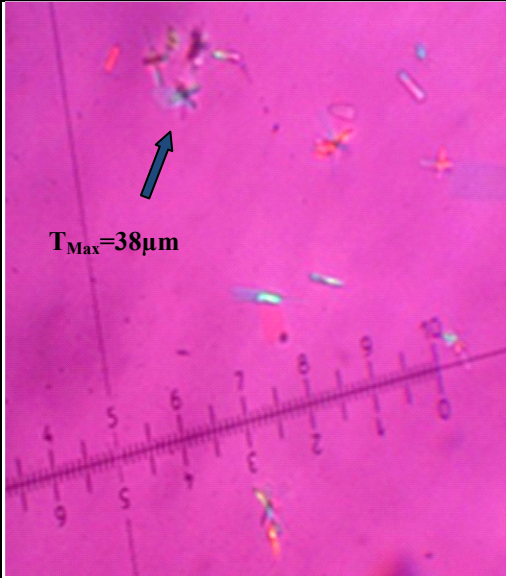
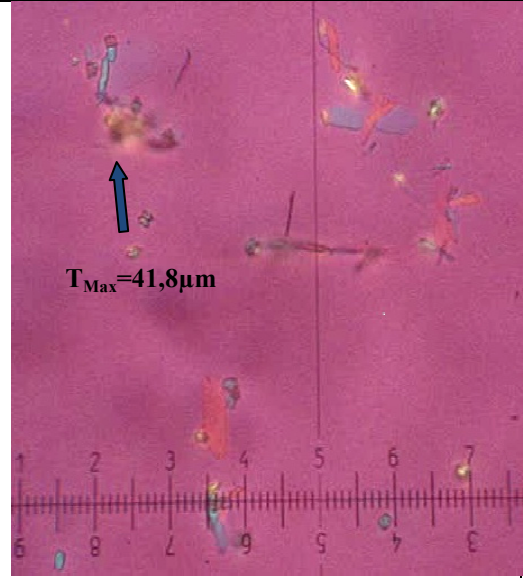
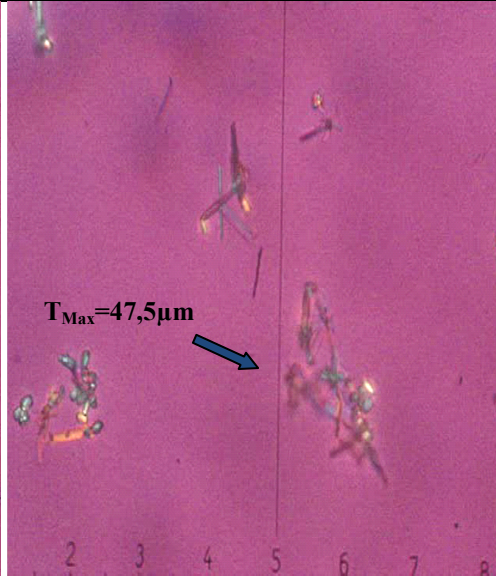


Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Après quelques minutes de cristallisation, les tailles maximales des agrégats ont été de 38 μm , 41,8 μm et 47,5 μm , après addition des solutions de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ aux concentrations 1mM, 4 mM et 16 mM respectivement. Les tailles ne se sont pas stabilisées tout au long des expériences, donc ce modèle ne répond pas au but de notre travail, puisqu'on ne peut pas tester la dissolution de ces agrégats.

- **Etude morphologique**

Les photographies 25, 26 et 27 confirment les résultats de la cinétique de la cristallisation oxalocalcique de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l), en additionnant une fois $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 1\text{mM}$, une fois $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 4\text{mM}$ et une autre fois $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 16\text{mM}$.

		
<p>Photographie 25: Agrégat d'oxalate de calcium ($[\text{Ox}] = 1\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}] = 4\text{mM}$) à $t = 60$ min en ajoutant $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 1\text{mM}$. T_{Max} agrégat = 38 μm (40x10).</p>	<p>Photographie 26 : Agrégat d'oxalate de calcium ($[\text{Ox}] = 1\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}] = 4\text{mM}$) à $t = 10$ min en ajoutant $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 4\text{mM}$. T_{Max} agrégat = 41,8 μm (40x10).</p>	<p>Photographie 27 Agrégat d'oxalate de calcium ($[\text{Ox}] = 1\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}] = 4\text{mM}$) à $t = 5$ min en ajoutant $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 16\text{mM}$. T_{Max} agrégat = 47,5 μm (40x10).</p>

Les photographies 25, 26 et 27 démontrent bien la présence d'agrégats d'oxalate de calcium. Les tailles maximales obtenues par ces expériences sont de 38 μm , 41,8 μm et 47,5 μm pour des concentrations respectives de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 1mM, 4mM et 16mM introduits à $t=15\text{min}$ de la cristallisation.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

3.1.2. Protocole 2

3.1.2.1. Expérience 1

✓ Mélange 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) avec 150 ml de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l)

- Analyse par microscope optique

Les résultats du suivi par microscope optique à lumière polarisante des tailles maximales des agrégats sont regroupés dans le tableau 22. Le cv calculé est inférieur ou égal à 8% en moyenne.

Tableau 22 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation de 150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 150ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).

Temps (min)	0	0,1	0,2	1	5	10	15	20	30	60	90
Taille maximale des agrégats (μm)	/	/	/	17	26,3	37	46,5	50,8	51	51	51

La cinétique de la taille maximale (μm) des agrégats en fonction du temps de cristallisation (min) est représentée dans la figure 25.

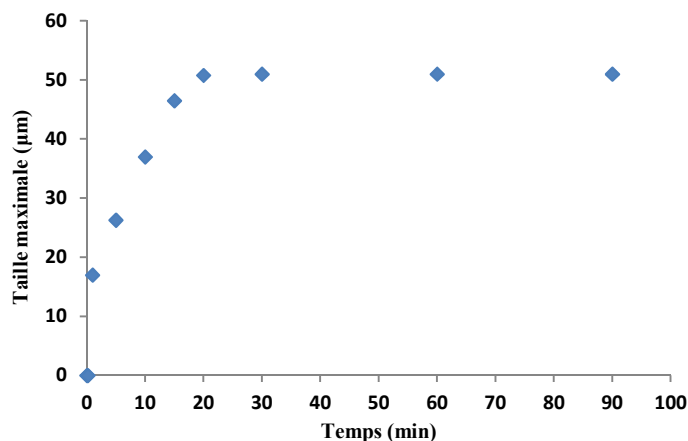


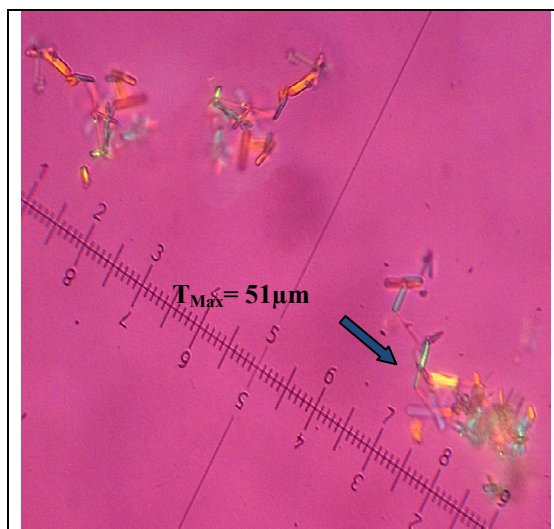
Figure 25 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps de la cristallisation de 150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 150ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).

Sur le tableau 22, on constate une stabilisation de la taille maximale des agrégats à 51 μm à partir 30 minutes, ce qui est représenté sur la figure 25. Pour apprécier la dissolution des substances naturelles sur les agrégats de grande taille, ce résultat n'est pas satisfaisant.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

• Etude morphologique

La photographie 28 représente à $t=30\text{min}$, les agrégats d'oxalate de calcium du mélange de 150ml de la solution $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 150 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l).



**Photographie 28 : Agrégat d'oxalate de calcium ($[\text{Ox}]=1\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}]=4\text{mM}$)
 $t= 30 \text{ min}$. T_{Max} agrégat = $51 \mu\text{m}$ (40x10).**

Sur la photographie 28, on retrouve notre modèle de cristallisation oxalocalcique déjà étudié au chapitre précédent. Au lieu de mesurer la taille moyenne, on a mesuré la taille maximale obtenue et qui est de $51\mu\text{m}$ à partir de la trentième minute.

3.1.2.2. Expérience 2

✓ En ajoutant 0,588 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

• Analyse par microscope optique

Les résultats du suivi de la cinétique de la cristallisation oxalocalcique sont reportés dans le tableau 23. Une bonne reproductibilité et un cv inférieur à 9% ont été obtenus.

Tableau 23 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation en ajoutant 0,588 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30	45	90
Taille maximale des agrégats (μm)	46,5	30	36,2	36,2	36,2	38,5	38,5	38,5	38,5

La courbe de la figure 26 reporte la taille maximale (μm) des agrégats en fonction du temps de cristallisation (min).

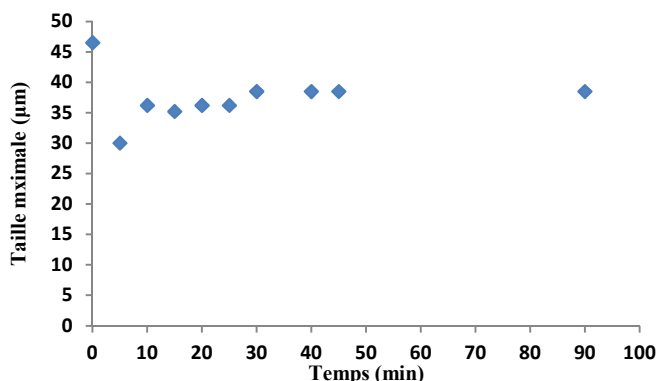
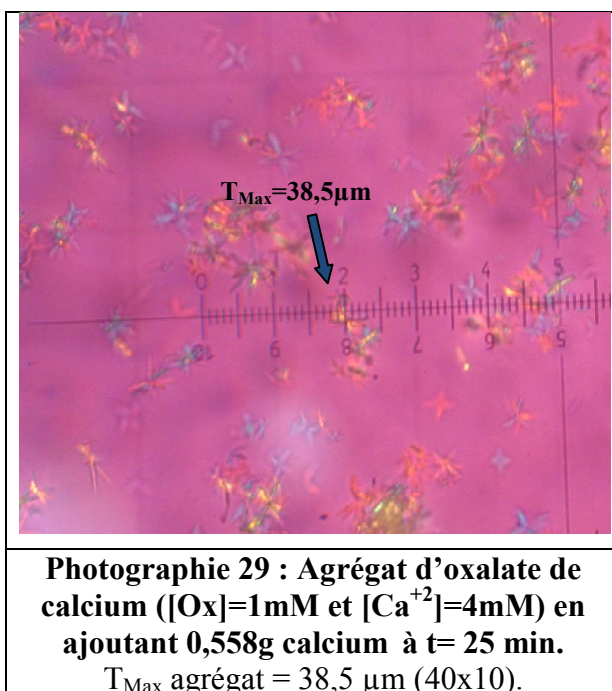


Figure 26 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 0,588 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

La taille maximale des agrégats pour les cinq premières minutes de la cristallisation a diminué de $46,5 \mu\text{m}$ à $30 \mu\text{m}$ après avoir ajouté $0,588 \text{ g}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ce qu'on peut voir sur le tableau 23. Ce résultat correspond à une dissolution des agrégats qui se reforment et atteignent une taille maximale de $38,5 \mu\text{m}$ après 25 minutes pour se stabiliser. Les courbes représentées sur la figure 26 confirment les résultats.

- **Etude morphologique**

Les agrégats obtenus après avoir additionné $0,588 \text{ g}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ au mélange 150 ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 150 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l) sont représentés sur la photographie 29.



Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Sur la photographie 29, on remarque un nombre élevé d'agrégats, ce qui est difficile d'étudier l'effet des substances sur les agrégats. La taille maximale mesurée est de 38,5 μm qui se stabilise à la vingt-cinquième minute, cela ne correspond pas à notre étude.

✓ En ajoutant 0,268 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$

- Analyse par microscope optique

L'urine artificielle (150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mmol/l) et 150 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol/l) obtenue après l'avoir enrichis d'une masse de 0,268 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, a donné des agrégats de tailles maximales représentés sur le tableau 24. Une bonne reproductibilité et un cv inférieur ou égal à 9%.

Tableau 24 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation en ajoutant 0,268 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30	45	90
Taille maximale des agrégats (μm)	17	22	22	23	25	22	23	25	23

La courbe de la figure 27, représente la taille maximale (μm) des agrégats en fonction du temps de cristallisation (min).

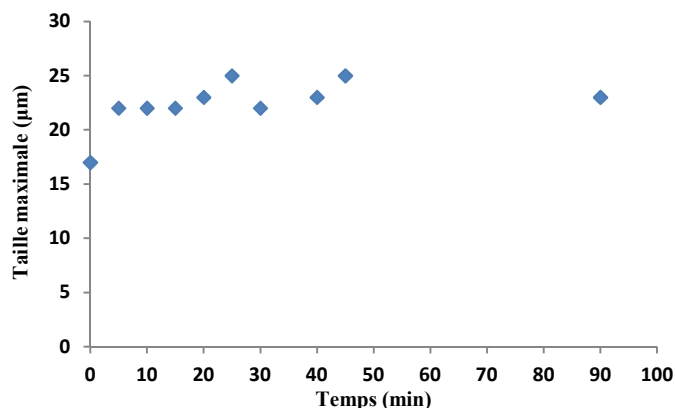


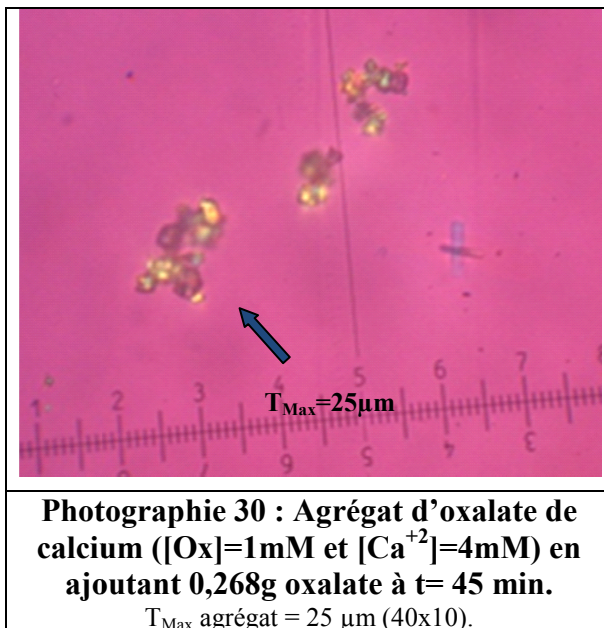
Figure 27 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 0,268g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

Sur le tableau 24, on remarque que la taille maximale des agrégats obtenus après avoir ajouté la masse de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ a été de 17 μm à $t=0\text{min}$, pour être au temps 20 et 45minutes de 25 μm , la figure 27 illustre les résultats. On peut interpréter cette expérience comme pour la précédente.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

- **Etude morphologique**

La photographie 30 montre des agrégats formés après 45min de cristallisation d'oxalate de calcium.



La prise de la photographie 30 au temps 45 minutes de la cristallisation, confirme la présence d'agrégats d'oxalate de calcium. On a obtenu des tailles maximales de 25 μm après avoir ajouté 0,268g d'oxalate, ce qui est trop petit pour notre étude.

✓ **En ajoutant 1,126 g de $Na_2C_2O_4$ et 4,704 g de $CaCl_2, 2H_2O$**

- **Analyse par microscope optique**

Les résultats de la cinétique de la cristallisation ont été obtenus avec une bonne reproductibilité dont le cv est inférieur ou égal à 5,25% en moyenne. Le tableau 25 regroupe les tailles observées après avoir ajouté 1,126 g de $Na_2C_2O_4$ et 4,704 g de $CaCl_2 2H_2O$ à notre urine artificielle.

Tableau 25 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation en ajoutant 1,126 g de $Na_2C_2O_4$ et 4,704 g de $CaCl_2 2H_2O$.

Temps (min)	0	0,1	0,2	1	3	5	10	15	20	30	60	90
Taille maximale des agrégats (μm)	/	/	/	18,7	25	31,2	Forte sursaturation					

La figure 28, représente la taille maximale (μm) des agrégats en fonction du temps de cristallisation (min).

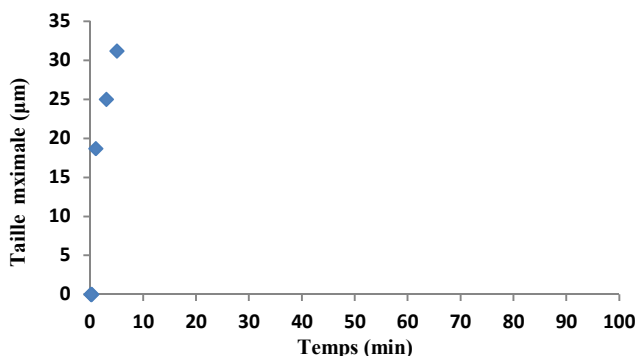
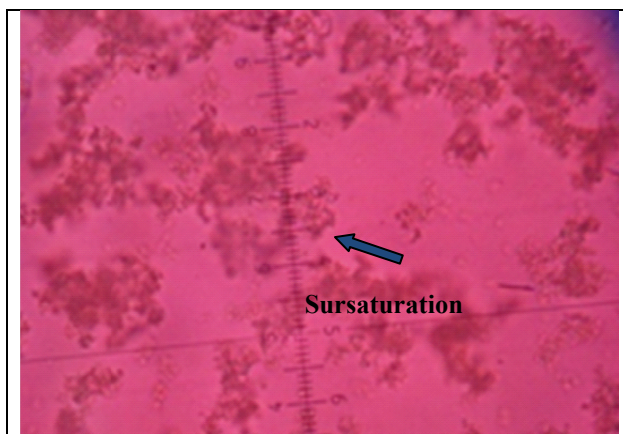


Figure 28 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 1,126 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ et 4,704 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$.

On remarque sur le tableau 25, qu'après 5 minutes de cristallisation et en présence de 1,126 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ solide, la taille maximale d'agrégats est de 31,2 μm . Mais après addition de 4,704 g de CaCl_2 , il a été difficile de distinguer les faciès et de mesurer les tailles des agrégats à cause de la densité très élevée de ces dernières, cela est représenté sur la figure 28. En effet, des urines fortement sursaturées en oxalate de calcium ont tendance à contenir un grand nombre de petites particules (microcristaux) de whewellite ou de wheddellite. Inversement, une urine à sursaturation élevée et de moindre amplitude contient moins de cristaux, mais de grandes dimensions (17).

- **Etude morphologique**

La représentation des agrégats à $t=90\text{min}$ est illustrée sous forme de photographie 31.



Photographie 31 : Agrégat d'oxalate de calcium ($[\text{Ox}]=1\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}]=4\text{mM}$) en ajoutant 1,126g Ox et 4,704g Ca^{+2} et à $t= 90$ min. Sursaturation (40x10).

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Sur la photographie 31, on enregistre une densité élevée d'agrégats avec de petits cristaux. La mesure des tailles n'a pas été possible, c'est pourquoi ce modèle ne peut pas être choisi.

3.1.3. Protocole 3

3.1.3.1. Expérience 1

✓ En mélangeant 100 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) avec 100 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l)

• Analyse par microscope optique

Les tailles maximales des agrégats de notre urine artificielle sont regroupées sur le tableau 26. Un cv inférieur ou égal à 10% en moyenne a été obtenu.

Tableau 26 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 180 minutes de cristallisation de 100ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) et 100ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l).

Temps (min)	0	5	10	15	25	30	35	60	90	120	180
Taille maximale des agrégats (μm)	35	24,5	26,5	24,5	21	24	24,5	26	25	26	21

La cinétique de la taille maximale (μm) des agrégats en fonction du temps de cristallisation (min) est reportée sur la figure 29.

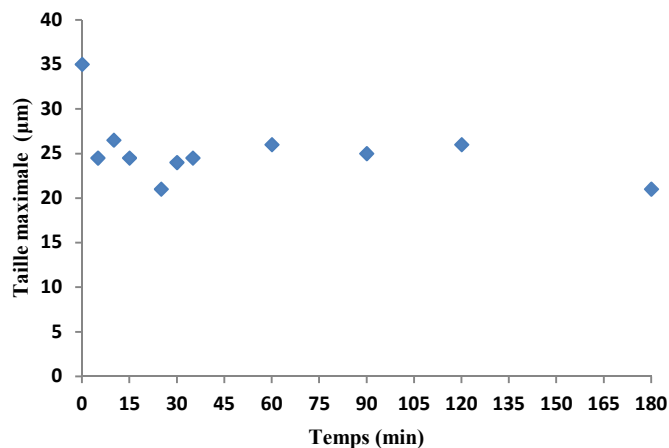


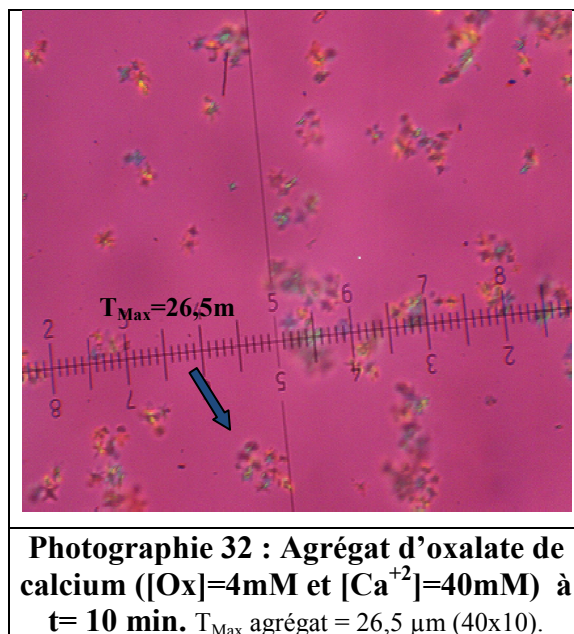
Figure 29 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) et $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l).

Les résultats de la cinétique montrent qu'on a obtenu une taille maximale de 26,5 μm à 10 minutes de la cristallisation qui a diminué pour atteindre 21 μm à 180 minutes. Ces résultats sont montrés sur le tableau 26 et la figure 29.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

• Etude morphologique

La photographie 32 montre l'agrégat formé au temps dix minutes de la cristallisation oxalocalcique ($[Ox]=4mM$ et $[Ca^{+2}]=40mM$).



Sur la photographie 32, on remarque une présence de quantité importante d'agrégats. La taille la plus grande est de 26,5 μm obtenue à la dixième minute. Cette cristallisation ne correspond pas à notre étude, la taille maximale reste petite.

3.1.3.2. Expérience 2

- ✓ En ajoutant une solution de 100 ml de $Na_2C_2O_4$ à 4 mmol/l
- Analyse par microscope optique

Après 15 minutes de la cristallisation d'une solution de 200 ml de l'urine artificielle dont la concentration en calcium et en oxalate est respectivement 40 mM et 4 mM, on a introduit 100 ml d'une solution d'oxalate de sodium de 4mM. Le cv obtenu a été inférieur à 10%. Les résultats obtenus de cette cristallisation sont représentés dans le tableau 27.

Tableau 27 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 180 minutes en ajoutant 4 mM de $Na_2C_2O_4$.

Temps (min)	0	5	10	15	25	30	35	60	90	120	180
Taille maximale des agrégats (μm)	24,5	24,5	26,5	24,5	21	24	24,5	26	25	26	21

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

La cinétique de la taille maximale (μm) des agrégats en fonction du temps de cristallisation (min) est reportée sur la figure 30.

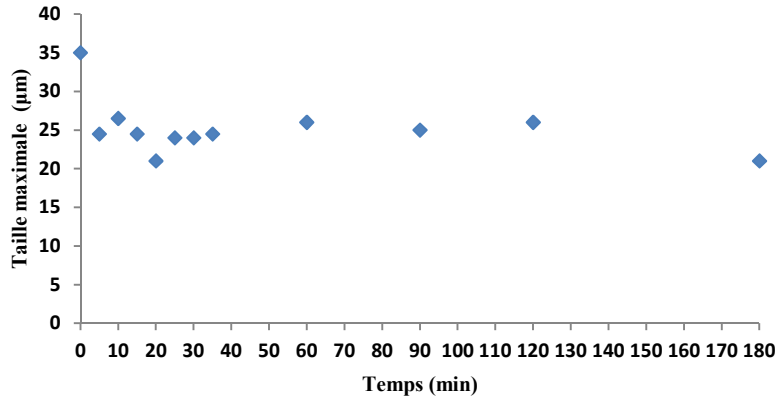
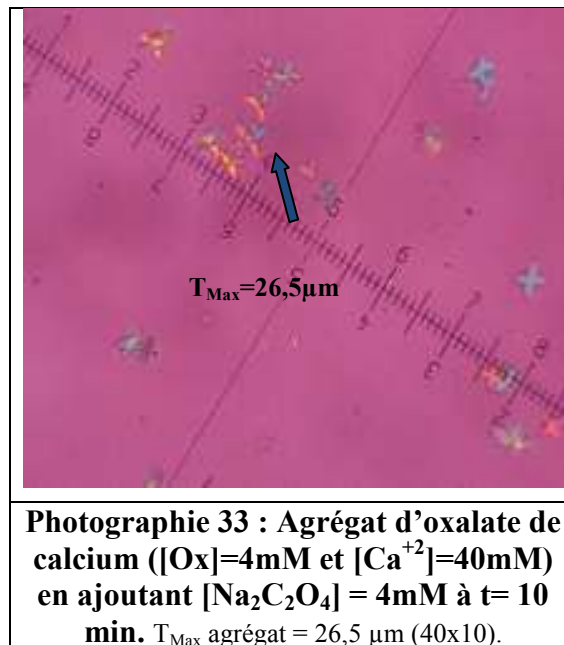


Figure 30 : Taille maximale des agrégats d'oxalate de calcium en fonction du temps et en présence de 4mM de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

À partir de des résultats du tableau 27, on a remarqué que la taille des agrégats est instable et atteint 21 μm après 180 minutes. Ce modèle de cristallisation ne nous aide pas à tester l'effet des substances naturelles sur les agrégats. La figure 30 atteste les données.

- **Etude morphologique**

Les agrégats obtenus à $t= 10$ minutes, de notre urine artificielle ($[\text{Ox}]=4\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}]=40\text{mM}$) obtenus après avoir additionné 4mM d'oxalate sont illustrés sur la photographie 33.



Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Sur la photographie 33, on remarque que la taille maximale des agrégats obtenus est de 26,5 μm du mélange de 40 mM et 4 mM de calcium et d'oxalate respectivement et l'ajout ensuite d'une concentration de 4 mM d'oxalate a donné des agrégats instables. C'est pourquoi on ne peut pas utiliser cette cristallisation pour notre étude.

✓ **En ajoutant une urine lithiasique diluée à 10% (v/v) et 20% (v/v)**

- **Analyse par microscope optique**

On a ajouté à notre milieu réactionnel à temps zéro une fois un volume de 100 ml d'une urine diluée à 10% (v/v) et une autre fois une urine à 20% (v/v). Cette urine appartient à un sujet lithiasique âgé de 45 ans, de sexe féminin, dont la cristallurie est positive, avec présence de cristaux de whewellite et son calcul récupéré est de type Ia, qui dévoile une hyperoxalurie. Cette urine diluée a été additionnée à notre solution cristallisable de concentration molaire en calcium et en oxalate de 40mM et 4mM respectivement. Les valeurs cinétiques de la cristallisation sont regroupées dans le tableau 28. La reproductibilité des résultats a permis d'avoir un cv inférieur ou égal à 9%.

Tableau 28 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation en ajoutant 10%(v/v) et 20%(v/v) des urines lithiasiques diluées.

Substances ajoutées	Temps (min)	0	1	5	10	25	30	40	60	90
Urine lithiasique diluée à 10% (v/v)	Taille maximale des agrégats (μm)	24,5	36,3	50	56	51,3	48	51,3	48	43
Urine lithiasique diluée à 20% (v/v)		24,5	31,3	50	50	39,3	43	46,3	35	35

On a tracé les courbes représentant la taille maximale des agrégats (μm) en fonction du temps (min) sur la figure 31.

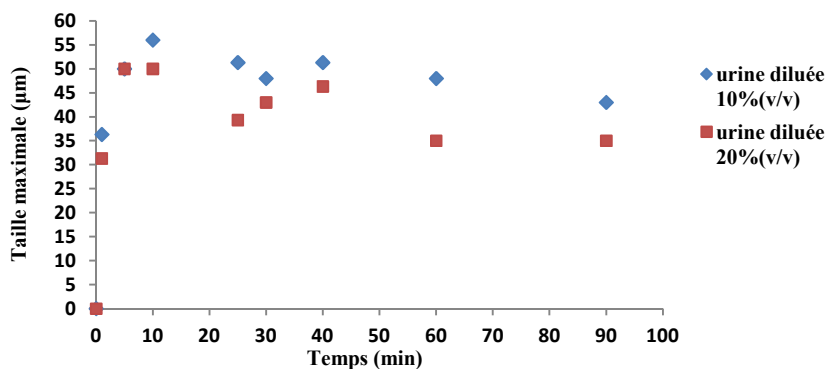


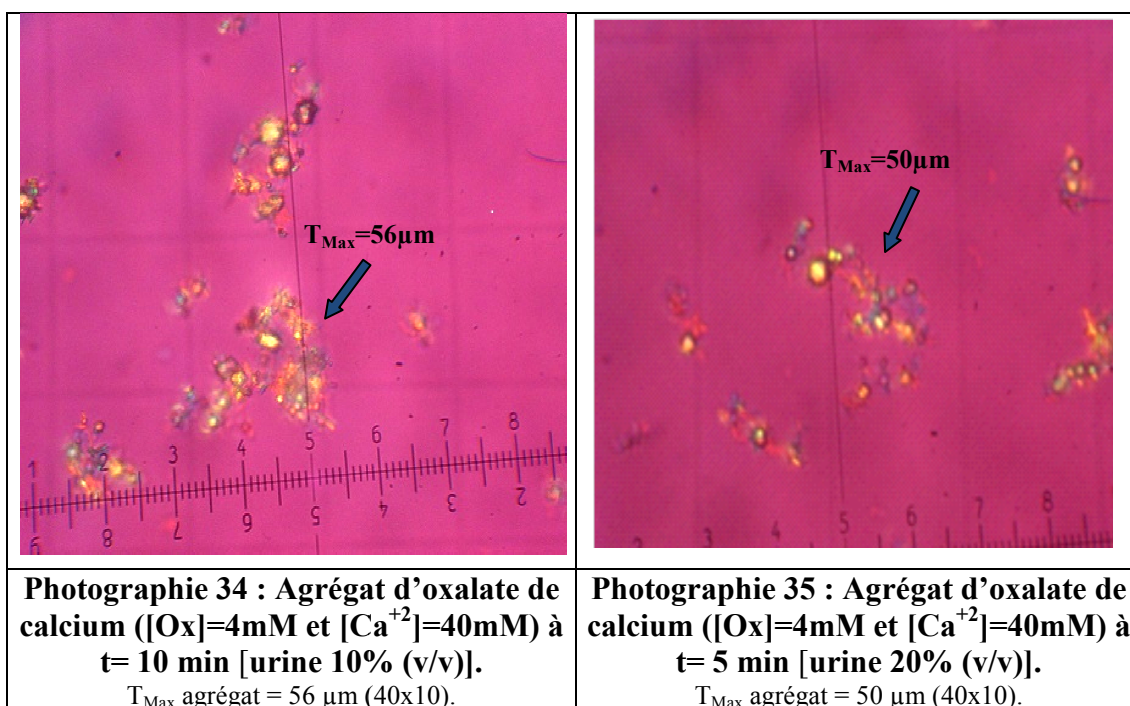
Figure 31 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps et en présence de 10% (v/v) et 20% (v/v) des urines lithiasiques diluées.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

À partir de la courbe de dilution à 10% (v/v) de la figure 31, on a enregistré une instabilité de la taille des agrégats qui a atteint à la fin de l'expérience 43 μm . Pour une concentration de 20% (v/v) des urines diluées, on remarque sur le tableau 28, la taille des agrégats s'est stabilisé après 60 minutes pour atteindre à la fin de l'étude cinétique 35 μm . Celle-ci est moins importante que la première dilution.

- **Etude morphologique**

Les photographies ci-dessous confirment les résultats observés par microscope à polarisation de la cristallisation oxalocalcique.



La cristallisation oxalocalcique en présence d'urine diluée à 10% (v/v) d'un sujet lithiasique peut faire l'objet de notre travail. On a obtenu des agrégats de grandes tailles de 56 μm au temps 10 minutes (photographie 34), mais pour une bonne reproductibilité on doit utiliser la même urine lithiasique, ce qui n'est pas facile. Aussi, la taille n'est pas restée constante. C'est pour cela, on doit chercher d'autres agrégats pour notre étude.

3.1.4. Protocole 4

✓ On a mélangé 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 10 mmol/l avec 150 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 40 mmol/l

• **Analyse par microscope optique**

Pour les concentrations de 40 mM de chlorure de calcium et 10 mM de l'oxalate de sodium, on a procédé au même protocole décrit précédemment. Le cv obtenu a été inférieur à 10%. Les résultats de la cristallisation obtenus sont résumés sur le tableau 29.

Tableau 29 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 90 minutes de cristallisation de 150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (10 mmol/l) et 150ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l).

Temps (min)	0	1	3	5	10	15	20	30	45	60	90
Taille maximale des agrégats (μm)	0	25	53,7	71,2	71,2	78,7	80	95	81,3	87	81

La figure 32 représente la taille maximale (μm) des agrégats en fonction du temps de cristallisation (min).

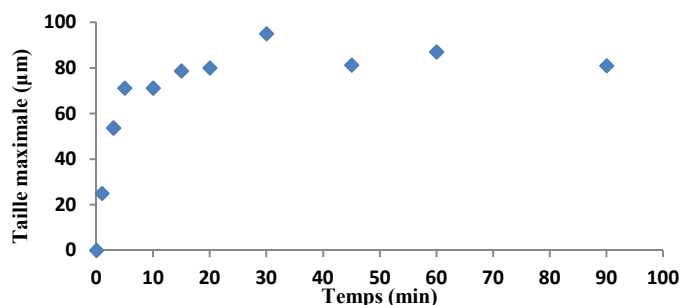


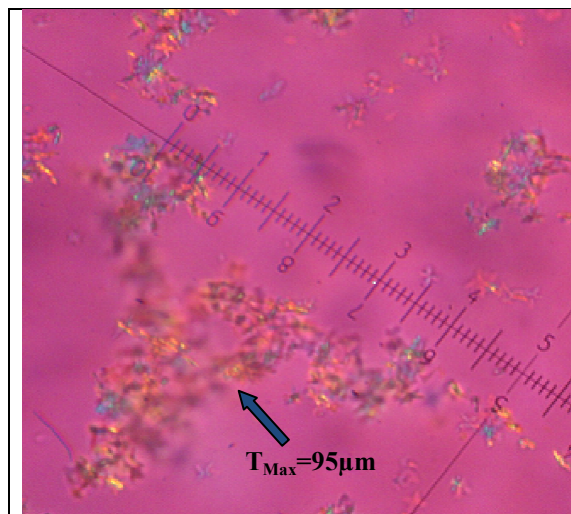
Figure 32 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps de la cristallisation de 150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (10 mmol/l) et 150ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmol/l).

Les résultats de la cinétique de la figure 32 montrent qu'on a obtenu une taille importante des agrégats de 95 μm à 30 minutes de la cinétique, qui a diminué à 90 minutes pour atteindre 81 μm (tableau 29). Cette cristallisation d'oxalate de calcium peut devenir notre modèle d'étude, mais avec des difficultés.

• **Etude morphologique**

La photographie 36 est prise au temps 30 minutes de la cristallisation oxalocalcique ($[\text{Ox}]=10\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}]=40\text{mM}$).

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles



Photographie 36 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=10mM et [Ca⁺²]=40mM) à t= 30 min. T_{Max} agrégat = 95 µm (40x10).

Sur la photographie 36, on remarque un agrégat de grande taille de 95 µm à 30 min avec une densité élevée. Tout au long de la cinétique, la taille n'est pas restée stable, il serait difficile d'observer le pouvoir inhibiteur des substances naturelles sur des agrégats instables.

- ✓ On a mélangé 150 ml de Na₂C₂O₄ à 4 mmol/l avec 150 ml CaCl₂, 2H₂O à 10 mmol/l
- Analyse par microscope optique

Dans cette étude, l'urine artificielle qui servira à notre étude a été préparée par un mélange de deux solutions ramenées à une température de 37 °C, dans un bain-marie sous agitation constante. En effet, un même volume de 150 ml de solution d'oxalate de sodium anhydre est mélangé à la solution de chlorure de calcium. Les concentrations respectives en calcium et en oxalate au sein du mélange sont de 10mM et 4mM. On a suivi en fonction du temps, les taille maximales des agrégats formés et sont représentées dans le tableau 30. Les résultats de la cinétique de cristallisation sont obtenus avec une bonne reproductibilité dont le cv est inférieur ou égal à 4% en moyenne.

Tableau 30 : Evolution de la taille maximale des agrégats pendant 120 minutes de cristallisation de 150ml Na₂C₂O₄ (4 mmol/l) et CaCl₂, 2H₂O (10 mmol/l).

Temps (min)	0	0,1	2	5	10	15	20	30	40	45	60	90	120
Taille maximale des agrégats (µm)	0	28,7	33,8	42,5	51,2	55,8	62,5	66,8	68,8	69,3	69,7	69,7	69,7

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

La courbe de la cinétique de cristallisation d'oxalate de calcium est représentée sur la figure 33.

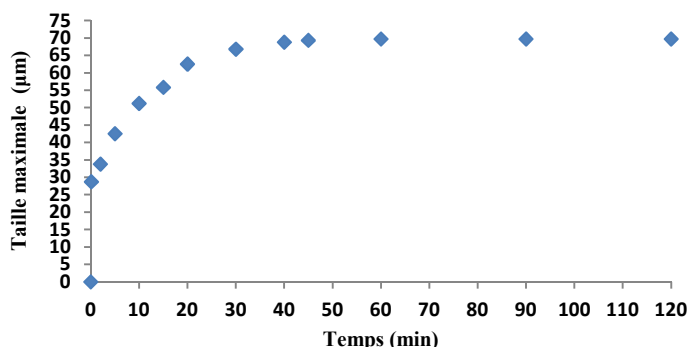
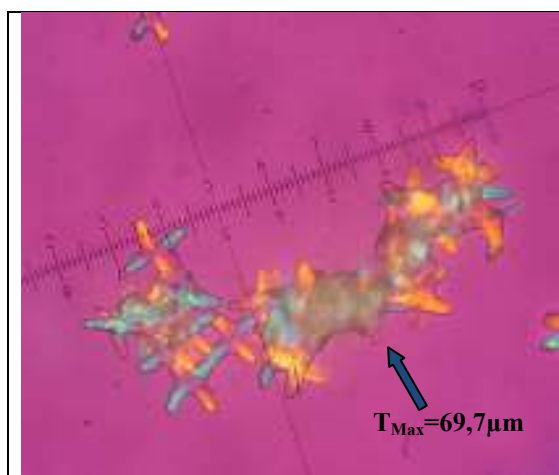


Figure 33 : Taille maximale des agrégats en fonction du temps de la cristallisation de 150ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mmol/l) et $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol/l).

La cristallisation oxalocalcique est spontanée, on se retrouve en présence de cristaux et d'agrégats simultanément. Les trois étapes (germination, croissance cristalline et agrégation) ne sont pas séparées dans le temps. On remarque sur la figure 33, une stabilisation de la taille des agrégats après 60 minutes de la cristallisation qui atteint à la fin de l'expérience 69,7 µm (tableau 30). Ce modèle correspond à notre étude, c'est pourquoi il a été choisi pour le reste de nos expériences.

• Etude morphologique

La photographie ci-dessous est l'agrégat formé en mélangeant 150 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 4 mmol/l avec 150 ml $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 10 mmol/l.



Photographie 37 : Agrégat d'oxalate de calcium ($[\text{Ox}]=4\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}]=10\text{mM}$) à $t=120$ min. T_{Max} agrégat = 69,7 µm (40x10).

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

La photographie 37 montre un agrégat de taille importante de 69,7 μm avec des cristaux de grande taille, ce modèle est adéquat pour observer l'effet des substances naturelles sur la taille, la morphologie et le faciès des cristaux.

Le tableau 31 résume l'effet des substances promotrices à différentes concentrations et après addition des composés (solution ou solide) sur la taille des agrégats de la whewellite.

Tableau 31 : Récapitulatif de l'effet des substances promotrices sur la taille des agrégats des oxalates de calcium

Conditions de cristallisation	Concentration de produit ajouté	Taille maximale moyenne (μm)	Temps de stabilisation (min)
$[\text{Ca}^{2+}] = 4\text{mmol/l}$ (V=100ml) $[\text{Ox}^{2-}] = 1\text{mmol/l}$ (V=100ml)	/	55,9	60
	$[\text{Ox}^{2-}] = 1\text{mmol/l}$ (V=100ml)	38	Instabilité
	$[\text{Ox}^{2-}] = 4\text{mM}$ (V=100ml)	41,8	Instabilité
	$[\text{Ox}^{2-}] = 16\text{mM}$ (V=100ml)	47,5	Instabilité
$[\text{Ca}^{2+}] = 4\text{mmol/l}$ (V=150ml) $[\text{Ox}^{2-}] = 1\text{mmol/l}$ (V=150ml)	/	51	30
	$m(\text{CaCl}_2) = 0,588\text{ g}$	38,5	25
	$m(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 0,268\text{ g}$	25	Instabilité
	$m(\text{CaCl}_2) = 4,704\text{ g}$ $m(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 1,126\text{ g}$	/	Instabilité
$[\text{Ca}^{2+}] = 40\text{mmol/l}$ (V=150ml) $[\text{Ox}^{2-}] = 10\text{mmol/l}$ (V=150ml)	/	95	Instabilité
$[\text{Ca}^{2+}] = 40\text{mmol/l}$ (V=100ml) $[\text{Ox}^{2-}] = 4\text{mmol/l}$ (V=100ml)	/	26,5	Instable
	Urine lithiasique diluée à 10% (v/v) (V=100ml)	56	Instabilité
	Urine lithiasique diluée à 20% (v/v) (V=100ml)	50	Instabilité
	$[\text{Ox}^{2-}] = 4\text{mM}$ (V=100ml)	26,5	Instabilité
$[\text{Ca}^{2+}] = 10\text{mmol/l}$ (V=150ml) $[\text{Ox}^{2-}] = 4\text{mmol/l}$ (V=150ml)	/	69,7	60

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Les résultats des 14 expériences réalisées par différentes méthodologies et différentes concentrations des solutions cristallisables ont donné une bonne reproductibilité et un $cv < 10$. La cristallisation avec les concentrations molaires $[Ca^{2+}] = 10$ mM et $[Ox^{2-}] = 4$ mM a donné des tailles d'agrégats assez importantes de $69,7 \mu m$ qui se sont stabilisés après 1 heure. Cette cristallisation semble être le modèle le plus adéquat pour l'étude de la dissolution des agrégats de whewellite qui est un phénomène essentiel.

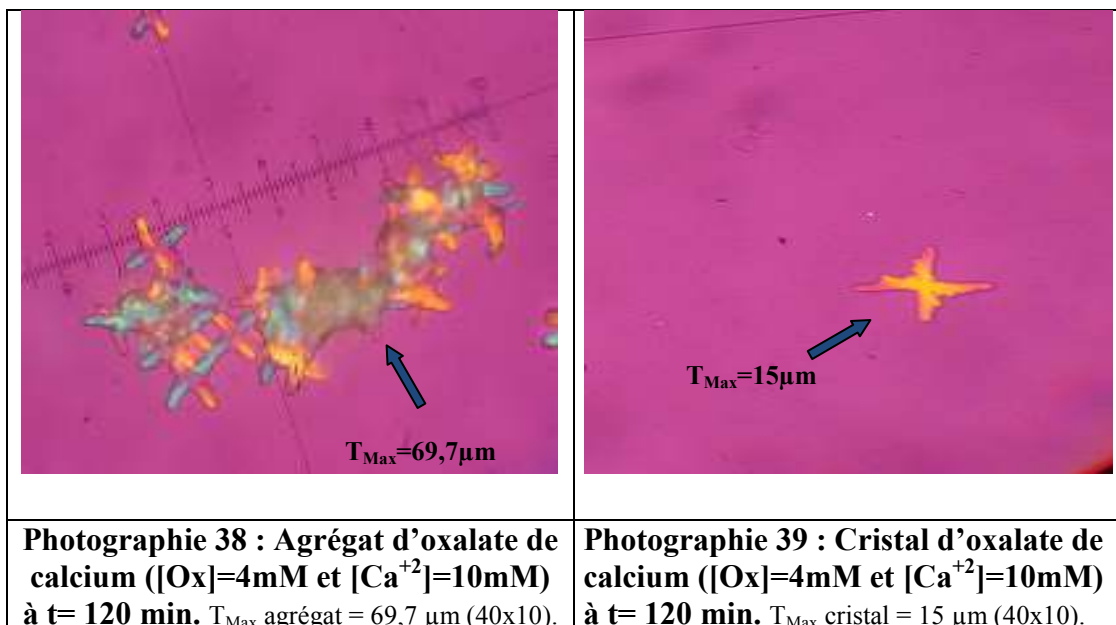
3.2. Morphologie des agrégats

L'oxalate de calcium est connu sous ses trois formes cristallines :

- Oxalate de calcium monohydraté (whewellite) ;
- Oxalate de calcium dihydraté (weddelite) ;
- Oxalate de calcium trihydraté.

Ces formes se distinguent les unes des autres par leur système de cristallisation, responsable de morphologies cristallines différentes (17).

Les concentrations molaires respectives 10mM et 4mM de calcium et d'oxalates à $37^\circ C$ feront l'objet de l'étude pour la dissolution. On a caractérisé le précipité obtenu par microscope optique à lumière polarisée, la seule structure cristalline formée d'oxalate de calcium dans la solution aqueuse est la whewellite sous forme de dendrite. L'identification des cristaux et des agrégats a été confirmée par une analyse morphologique en les comparant à ceux des planches d'identification données par Visith (18). Les photographies 38 et 39 confirment les résultats.

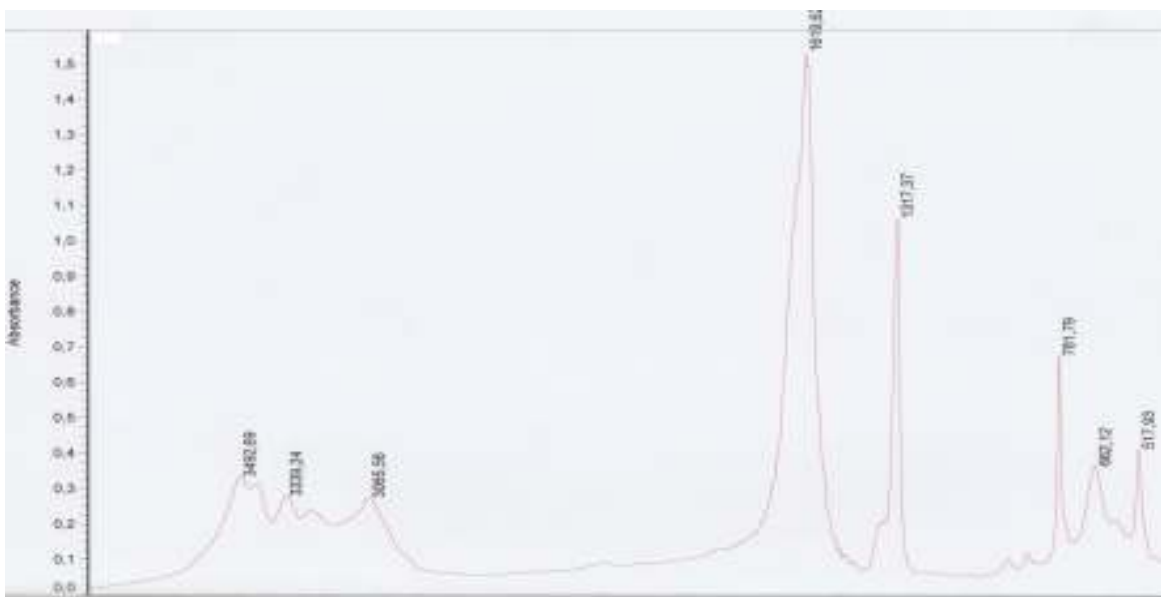


Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Les photographies 38 et 39 montrent des agrégats formés à 15 minutes et 120 minutes de la cristallisation dont les tailles sont respectivement 15 μm et 69,7 μm .

3.3. Analyse infrarouge à transformer de Fourier

Après avoir choisi le modèle de cristallisation pour notre étude de dissolution, on a analysé par infrarouge le culot du précipité récupéré pour identifier l'espèce. Le mélange de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 4 mmol/l et $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 10 mmol/l a donné le spectre suivant :



Spectre 12 : Spectre infrarouge de la cristallisation de l'oxalate de calcium de whewellite

On remarque sur le spectre 12, une bande forte à $1619,62 \text{ cm}^{-1}$ qui représente la bande de vibration de C=O, une bande fine à $1317,37 \text{ cm}^{-1}$ pour C-O, une vibration de valence H_2O en escalier de $3055,56$ à $3492,69 \text{ cm}^{-1}$ et une déformation H_2O hors du plan, fine à $781,79 \text{ cm}^{-1}$. Ce qui confirme la présence whewellite en comparant le spectre 12 avec le spectre de référence 1(chapitre II-1).

3.4. Dissolution des agrégats de la whewellite

Dans cette étude, on a testé le pouvoir inhibiteur du vinaigre, du jus de citron et de la *Nigella sativa* sur les agrégats d'oxalate de calcium monohydraté de grandes tailles choisis précédemment. Le tableau 32 regroupe les pH des trois substances.

Tableau 32 : pH des trois substances.

	Jus de citron	Vinaigre	Nigella sativa (2g/100ml)	Nigella sativa (4g/100ml)
pH	2,43	2,61	6,2	6,12

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

3.4.1. Dissolution des agrégats de Whewellite par le vinaigre

3.4.1.1. Analyse par microscope optique

Le suivi de la cinétique de la dissolution des agrégats oxalocaliques par le vinaigre aux concentrations 5% (v/v), 10% (v/v), 25% (v/v) et 50% (v/v), a donné les résultats qui sont représentés sur le tableau 33. Le cv reste inférieur à 10%.

Tableau 33 : Evolution de la taille maximale des agrégats de whewellite en présence du vinaigre à différentes concentrations volumiques.

Temps	(min)	0	0,1	2	5	10	15	20	30	40	45	60	90	120
Urine artificielle	T_{Max}(µm)	0	27,5	33,8	42,5	52	55,7	60	66,2	68,8	69,3	69,7	69,7	69,7
	D(%)	0	19,37	25,54	29,55	31,85	34,15	38,16	39,60	41,03	41,03	41,89	41,75	41,75
[Vinaigre]=5% (v/v)	T_{Max}(µm)	69,7	56,2	51,9	49,1	47,5	45,9	43,1	42,1	41,1	41,1	40,5	40,6	40,6
	D(%)	0	28,26	46,91	56,96	56,96	56,95	56,95	60,54	60,54	61,55	62,41	64,13	64,13
[Vinaigre]=10% (v/v)	T_{Max}(µm)	69,7	50	37	30	30	30	30	27,5	27,5	26,8	26,2	25	25
	D(%)	0	39,70	49,78	58,11	57,39	58,39	59,68	64,13	62,41	64,70	64,70	67,00	67,00
[Vinaigre]=25% (v/v)	T_{Max}(µm)	69,7	49	35	29,2	29,7	29	28,1	25	26,2	24,6	24,6	23	23
	D(%)	0	55,24	69,44	74,89	76,76	76,76	77,04	78,48	78,48	78,48	78,48	79,48	79,48
[Vinaigre]=50% (v/v)	T_{Max}(µm)	69,7	31,2	21,3	17,5	16,2	16,2	16	15	15	15	15	14,3	14,3
	D(%)	0	55,24	69,44	74,89	76,76	76,76	77,04	78,48	78,48	78,48	78,48	79,48	79,48

T_{Max} : Taille maximale ; D (%) : Dissolution.

La représentation des résultats de la cristallisation d'oxalate de calcium est sous forme de courbe sur la figure 34.

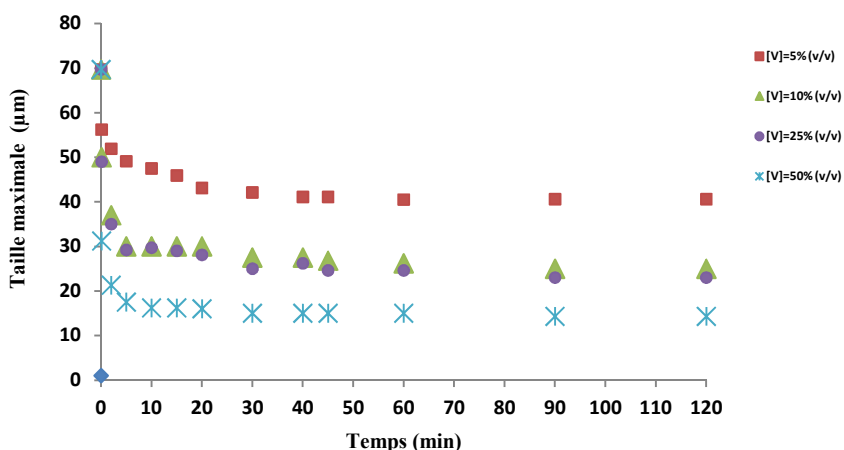
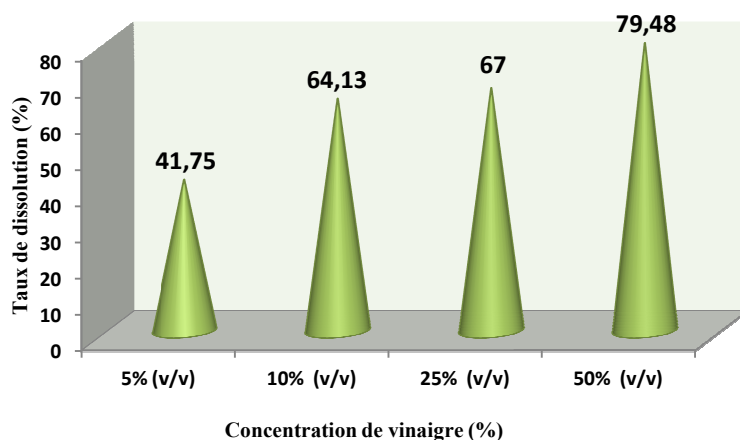


Figure 34 : Taille des agrégats de whewellite en présence de vinaigre à différentes concentrations.

Les courbes de la cinétique de dissolution de la figure 34 montrent que la taille des agrégats formés décroît progressivement avec l'augmentation de la concentration du vinaigre. Sur le tableau 33, on enregistre à la concentration 5% (v/v) une diminution de la taille de l'agrégat de 69,7 µm à 40,6 µm et elle est de 69,7 µm à 14,3 µm à la concentration 50% (v/v), ce qui est très appréciable.

L'histogramme 8, illustre le taux de dissolution des agrégats de whewellite selon les concentrations volumiques de vinaigre en fin d'expérience.



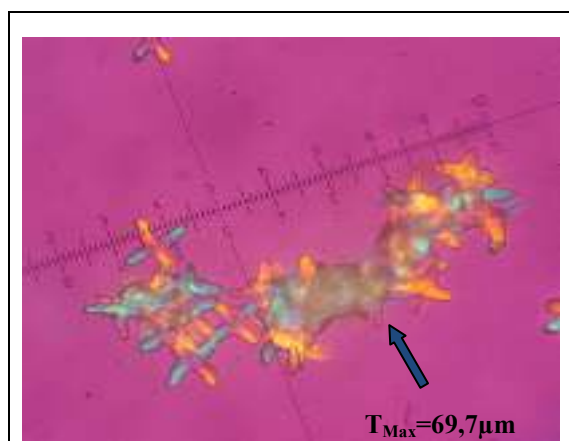
Histogramme 8 : Variation du taux de dissolution des agrégats des oxalates de calcium monohydratés en présence du vinaigre.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

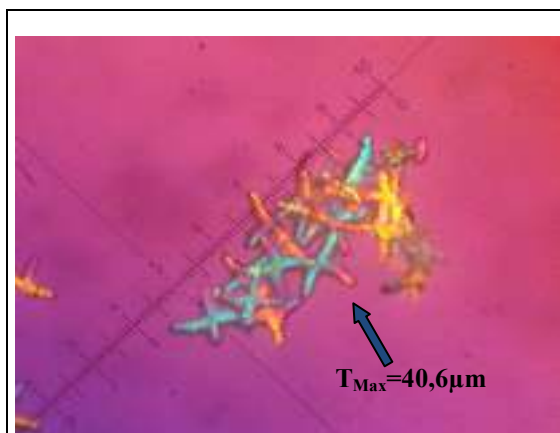
Le taux le plus important de dissolution de whewellite est de 79,48% constaté pour la concentration 50% (v/v). Les concentrations 25% (v/v) et 10% (v/v) du vinaigre ont donné respectivement des pourcentages de 67% et 64,13%. Même à 5% (v/v) de la concentration étudiée, la dissolution est de 41,75%, ce qui est considérable. Cette étude révèle que toutes les concentrations du vinaigre testées ont eu un effet de dissolution sur les agrégats.

3.4.1.2. Etude morphologique

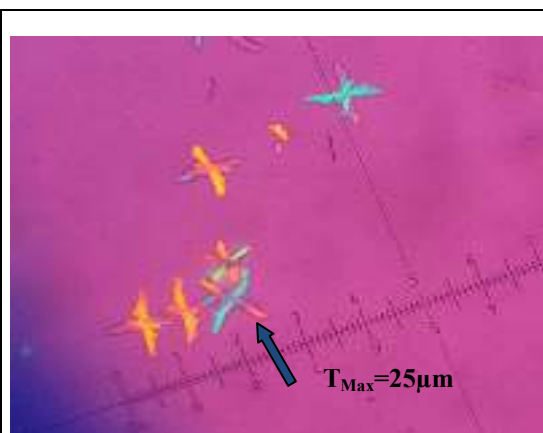
Les photographies (41,42, 43 et 44) prises in situ à $t=120\text{min}$, sont la représentation des résultats obtenus de la dissolution des agrégats par le vinaigre.



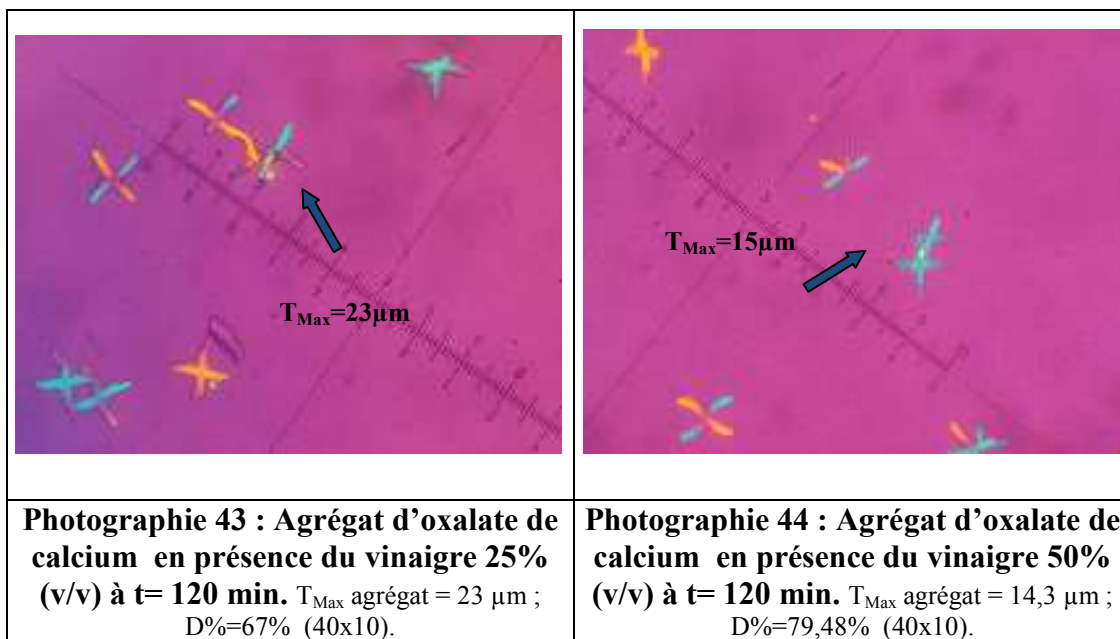
Photographie 40 : Agrégat d'oxalate de calcium ($[\text{Ox}]=4\text{mM}$ et $[\text{Ca}^{+2}]=10\text{mM}$) à $t=120\text{ min}$. T_{Max} agrégat = $69,7\ \mu\text{m}$ (40×10).



Photographie 41 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du vinaigre 5% (v/v) à $t=120\text{ min}$. T_{Max} agrégat = $40,6\ \mu\text{m}$; $D\%=41,75\%$; (40×10).



Photographie 42 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du vinaigre 10% (v/v) à $t=120\text{ min}$. T_{Max} agrégat = $25\ \mu\text{m}$; $D\%=64,13\%$ (40×10).



Sur les photographies, on remarque une dissolution des agrégats avec une dispersion. Le vinaigre a eu un bon effet sur les agrégats de grande taille, la taille a diminué à 15 μm pour la concentration 50% (v/v) du vinaigre. Ces résultats sont considérables pour la prévention de calculs rénaux.

3.4.2. Dissolution des agrégats de la whewellite par le jus de citron

3.4.2.1. Analyse par microscope optique

L'analyse des prélèvements de la cristallisation des agrégats de grande taille en présence du jus de citron a révélé un changement de morphologie. Cette différence est due à la dissolution et l'augmentation des particules fragmentées, caractérisée par une taille faible et une polarisation très intense en présence de 50% (v/v) de jus de citron. La reproductibilité de nos résultats a permis d'avoir un cv inférieur ou égal à 8% en moyenne pour toutes les concentrations. Le tableau 34 illustre les résultats.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Tableau 34 : Evolution de la taille maximale des agrégats de whewellite en présence du jus de citron à différentes concentrations volumiques.

Temps (min)	0	0,1	2	5	10	15	20	30	40	45	60	90	120	
Urine artificielle	T_{Max}(µm)	0	27,5	33,8	42,5	52	55,7	60	66,2	68,8	69,3	69,7	69,7	69,7
[Citron]=5% (v/v)	T_{Max}(µm)	69,7	25	25	23,7	21,8	21,8	21,8	20,6	20,6	20,6	19,7	17,8	16,8
	D(%)	0	64,13	64,13	66	68,72	66,72	68,72	70,44	70,44	70,44	71,74	74,46	75,9
[Citron]=10% (v/v)	T_{Max}(µm)	69,7	34,3	22,5	21,8	21,8	21,8	21,8	20	19,8	18,7	18,7	16,2	16,2
	D(%)	0	50,8	67,72	68,72	68,72	68,72	68,72	71,30	71,59	73,17	73,17	76,76	76,76
[Citron]=25% (v/v)	T_{Max}(µm)	69,7	34,3	22,5	21,8	21,8	21,8	21,8	20	18,6	18,6	18,6	15,75	15,7
	D(%)	0	50,8	67,72	68,72	68,72	68,72	68,72	71,30	73,31	73,31	73,31	77,4	77,47
[Citron]=50% (v/v)	T_{Max}(µm)	69,7	17,5	16,3	16,2	16	15	15	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2
	D(%)	0	74,89	76,61	76,76	77,04	78,48	78,48	83,93	83,93	83,93	83,93	83,93	83,93

T_{Max} : Taille maximale ; D (%) : Dissolution.

On a illustré sur la figure 35, la cinétique de dissolution des agrégats de la whewellite en présence de jus de citron à différentes concentrations volumiques.

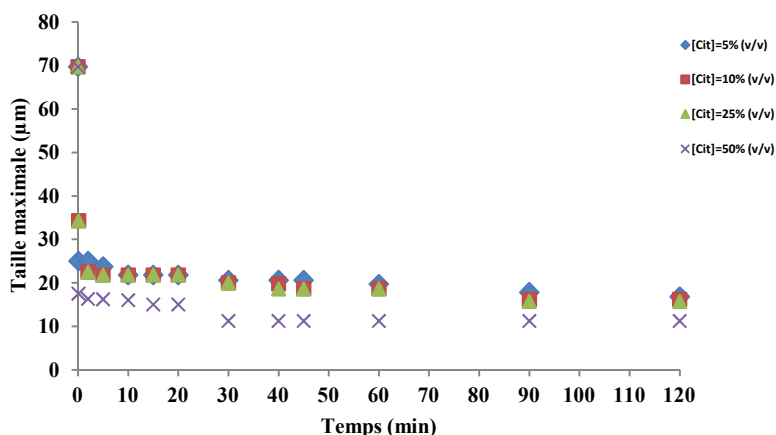


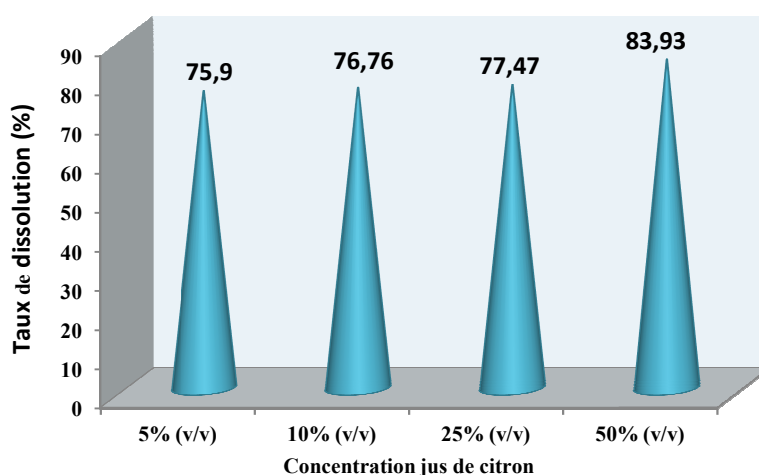
Figure 35 : Taille des agrégats de whewellite en présence de jus de citron à différentes concentrations.

De la figure 35, on remarque que cette substance a un fort pouvoir de dissolution des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté. La diminution de la taille d'agrégats est à la concentration de 5% (v/v), de 69,7 µm à 16,8 µm et à la

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

concentration 50% (v/v), elle est très importante de 69,7 μm à 11,2 μm (tableau 34). D'après les travaux de Hennequin (16, 19), l'acide citrique contenant dans la substance étudiée réagit sur les ions Ca^{2+} , en les complexant et donnant ainsi un sel très soluble qui peut être facilement éliminé.

L'histogramme 9 illustre le taux de dissolution des agrégats de whewellite selon les concentrations volumiques du jus de citron en fin d'expérience.



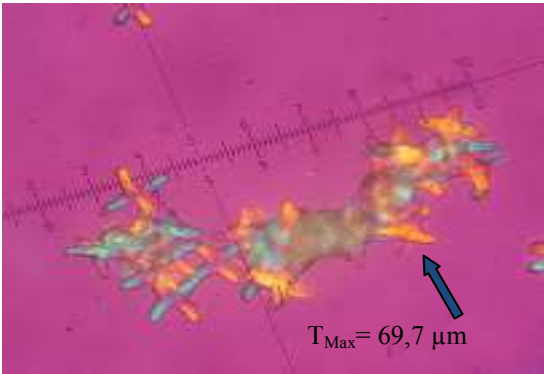
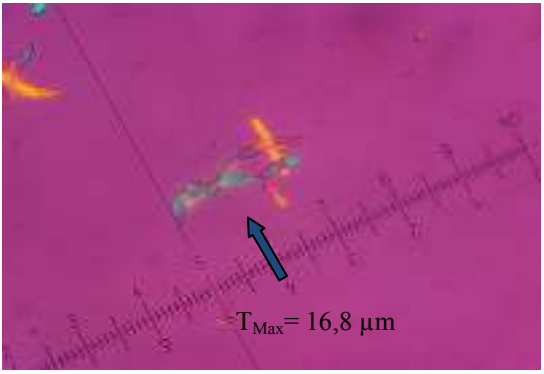
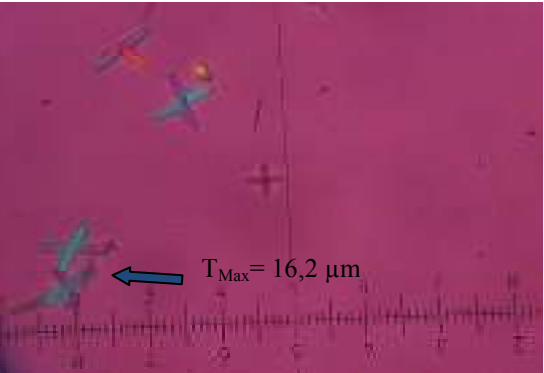
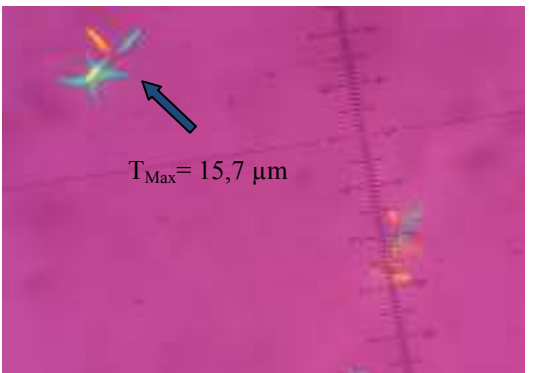
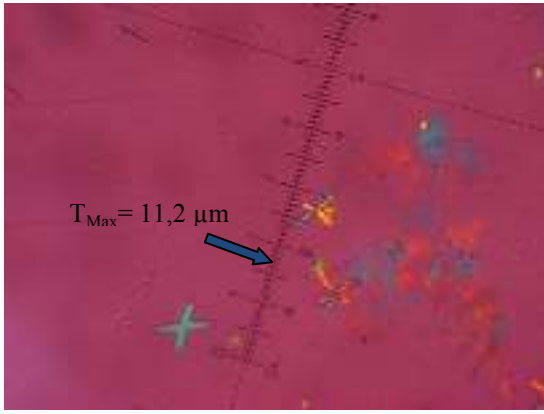
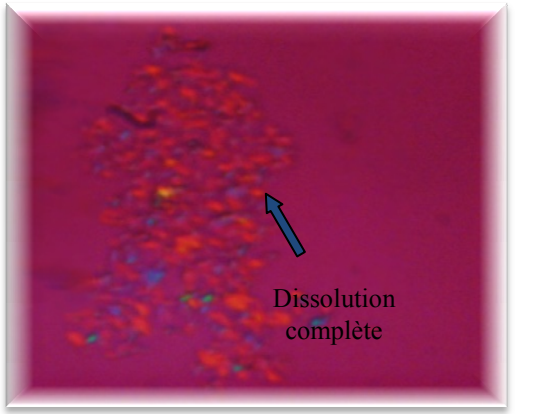
Histogramme 9 : Variation du taux de dissolution des agrégats des oxalates de calcium monohydratés en présence du jus de citron

Sur l'histogramme ci-dessus, on distingue une dissolution très importante de 83,93% correspondant à une concentration volumique de 50% (v/v) et un taux moyen de dissolution le moins élevé de 75,9% correspondant à 5% (v/v). Quant aux concentrations 10% (v/v) et 25% (v/v) du jus de citron, la dissolution est de 76,76% et 77,47% respectivement.

3.4.2.2. Etude morphologique

Les photographies (46-50) prises in situ sont les représentations des résultats obtenus par l'addition du citron après 60 minutes et à la fin de l'expérience.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

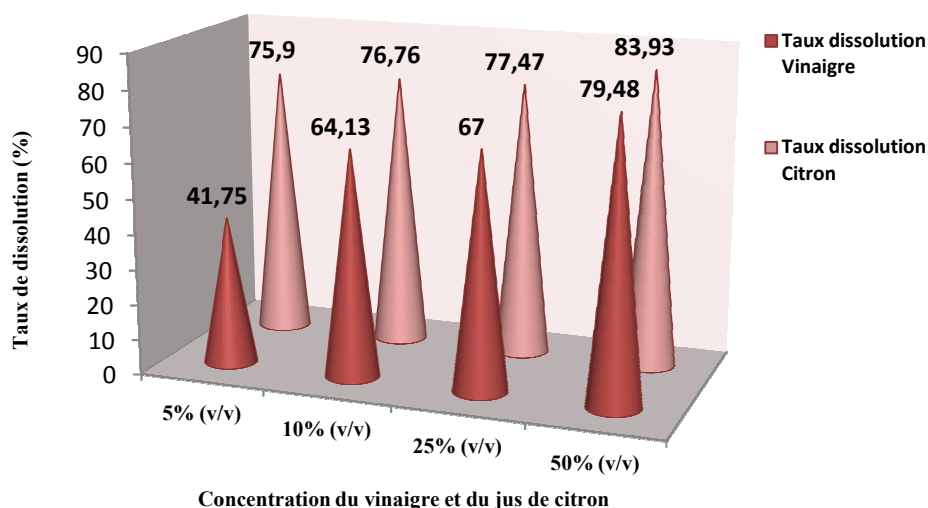
	
<p>Photographie 45 : Agrégat d'oxalate de calcium ([Ox]=4mM et [Ca⁺²]=10mM) à t= 120 min. T_{Max} agrégat = 69,7 µm (40x10).</p>	<p>Photographie 46 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus citron 5% (v/v) à t= 120 min. T_{Max} agrégat = 16,8 µm ; D%=75,9% ; (40x10).</p>
	
<p>Photographie 47 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus citron 10% (v/v) à t= 120 min. T_{Max} agrégat = 16,2 µm ; D%=76,76% ; (40x10).</p>	<p>Photographie 48 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus citron 25% (v/v) à t= 120 min. T_{Max} agrégat = 15,7 µm ; D%=77,47% ; (40x10).</p>
	
<p>Photographie 49 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus citron 50% (v/v) à t= 120 min. T_{Max} agrégat = 11,2 µm ; D%=83,93% ; (40x10).</p>	<p>Photographie 50 : Agrégat d'oxalate de calcium en présence du jus de citron 25% (v/v) à t= 60 min. (40x10 x 2,5).</p>

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Les photographies confirment la dissolution des agrégats. Sur les photographies 50 une dissolution complète des agrégats, qui se caractérisent par une polarisation très intense et une diminution de taille importante.

3.4.3. Comparaison de la dissolution entre le jus de citron et le vinaigre

En étudiant la comparaison des taux de dissolution des agrégats en fonction des concentrations testées des deux substances, on a obtenu l'histogramme 10.



Histogramme 10 : Comparaison des taux de dissolution des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté par le vinaigre et le jus de citron.

À partir de cet histogramme, on remarque que les taux de dissolution du vinaigre pour toutes les concentrations testées sont inférieurs à ceux de jus de citron. On constate que l'effet majeur de la dissolution des agrégats de whewellite est celui du jus de citron.

3.4.4. Dissolution des agrégats de la whewellite par *Nigella sativa* en infusion

3.4.4.1. Analyse par microscope optique

Afin d'évaluer l'effet de la *Nigella sativa* sur les agrégats d'oxalate de calcium monohydraté, des solutions de 2g/100ml et de 4g/100ml de cette plante ont été préparées en infusion. Le suivi de la cinétique de la dissolution par *Nigella sativa* a donné les résultats représentés sur le tableau 35. Le cv reste inférieur à 10%.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Tableau 35 : Evolution de la taille maximale des agrégats de whewellite en présence de *Nigella sativa* en infusion.

Temps	(min)	0	0,1	2	5	10	15	20	30	40	45	60	90	120
Urine artificielle	T_{Max}(μm)	0	27,5	33,8	42,5	52	55,7	60	66,2	68,8	69,3	69,7	69,7	69,7
	[NS]=2g/100ml T_{Max}(μm)	69,7	43,75	37,5	31,25	31,25	31,25	31,25	28,75	28,75	28,75	27,5	27,5	27,5
	D(%)	0	37,23	46,2	55,16	55,16	55,16	55,16	58,75	58,75	58,75	60,54	60,54	60,54
[NS]=4g/100ml	T_{Max}(μm)	69,7	43,75	37,5	31,25	31,25	31,25	28,75	27,5	27,5	27,5	27,5	27,5	27,5
	D(%)	0	37,23	46,2	55,16	55,16	55,16	58,75	60,54	60,54	60,54	60,54	60,54	60,54

NS: *Nigella sativa*; T_{Max}: Taille maximale ; D (%): Dissolution.

La représentation des résultats de la dissolution des agrégats par les deux concentrations de la plante est sous forme de courbe sur la figure 36.

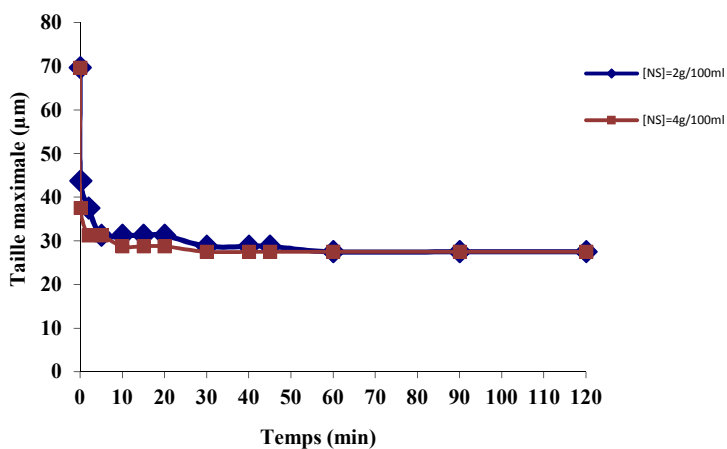
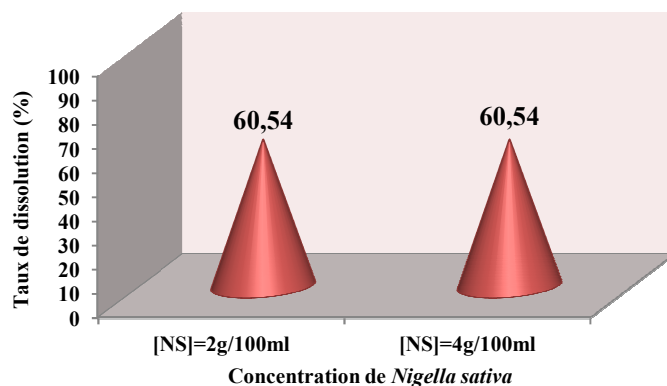


Figure 36 : Taille des agrégats de whewellite en présence de *Nigella sativa* en infusion.

On remarque sur la figure 36, la taille des agrégats formés décroît de moitié pour les deux concentrations et la dissolution reste constante malgré qu'on ait doublé la concentration. La taille maximale moyenne obtenue à la fin des expériences est de 27,5 μm pour les deux concentrations.

L'historgramme ci-dessous confirme les taux de dissolution obtenu pour les deux concentrations.

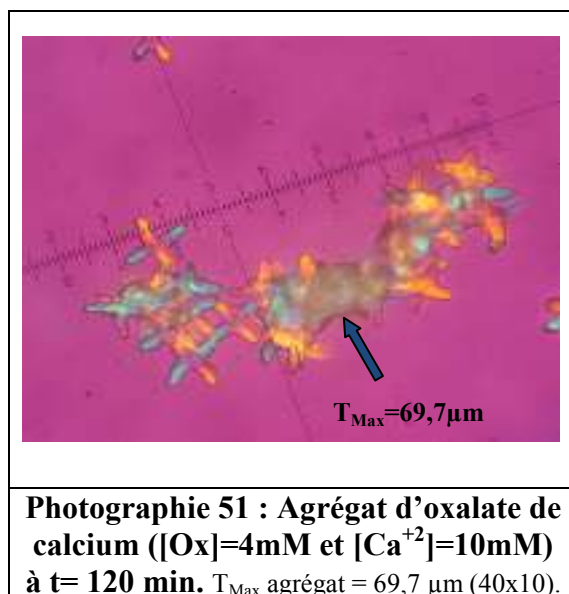


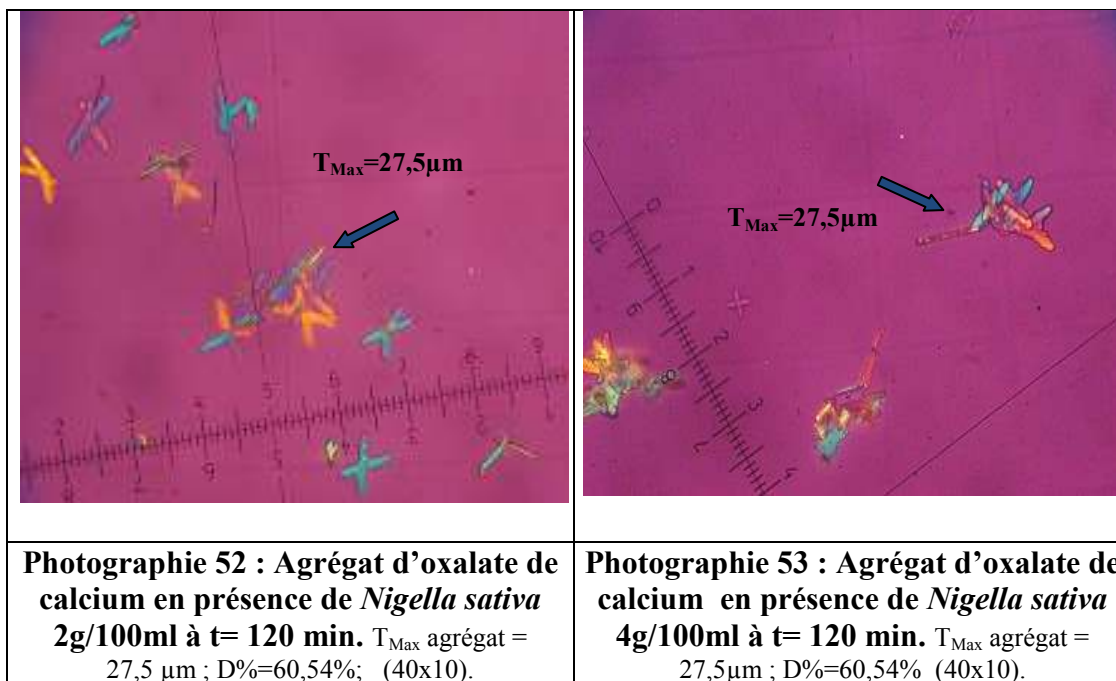
Histogramme 11 : Variation du taux de dissolution des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté en présence de *Nigella sativa* en infusion.

L'histogramme 11 montre bien l'égalité du pourcentage de dissolution pour la concentration 2g/100ml et 4g/100ml en fin d'expérience. Le taux le plus important est de 60,54% à la fin des deux cinétiques.

3.4.4.2. Etude morphologique

Pour mieux représenter les résultats, des photographies de la cinétique pour les deux concentrations ont été prises in situ à $t=120\text{min}$





Sur les photographies 52 et 53, des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté sont représentés avec une taille de 27,5 µm en fin d'expérience, pour la concentration 2g/100ml et 4g/100ml.

4. Discussion

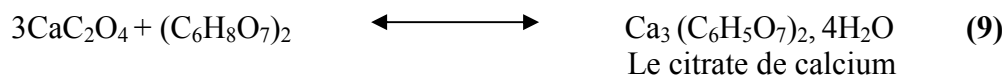
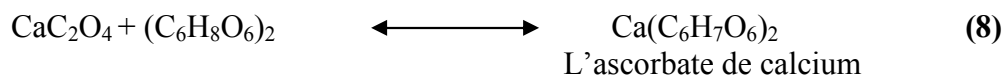
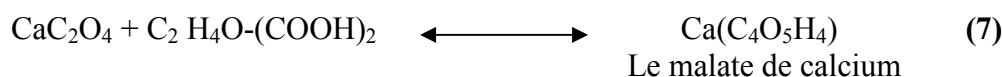
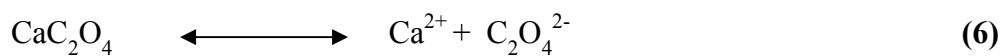
Notre travail a fait l'objet d'une étude sur l'effet de quelques substances naturelles sur des agrégats de grande taille et sur la morphologie des cristaux obtenus. Pour cela, deux étapes ont été réalisées. La première a été de déterminer les concentrations en calcium et en oxalate pour lesquelles la taille des agrégats est maximale, avec une morphologie qui répond à l'étude de la dissolution des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté. On a obtenu un modèle qui répond à ces conditions et se compose de calcium et d'oxalate de concentrations respectives de 10mmol/l et 4mmol/l avec un rapport molaire Ca/Ox de 2,5. D'après Daudon (20), ce dernier conditionne l'espèce cristalline de l'oxalate de calcium : 99% des cristallurites oxalocalciques comporte de la weddellite lorsque le rapport est supérieur à 14 (calcium fort) tandis que 94% comportent de la whewellite lorsque le rapport Ca/Ox est inférieur à 5 (oxalurie forte).

La Deuxième étape a été de suivre l'effet des substances naturelles citron, le vinaigre et *Nigella sativa* sur la dissolution des agrégats en fonction du temps, la densité et la taille des particules étudiées en solution. En effet, la taille des agrégats a diminué avec une augmentation du nombre de cristaux fissurés en extrémités ou même cassés ce qui peut être traduit par une

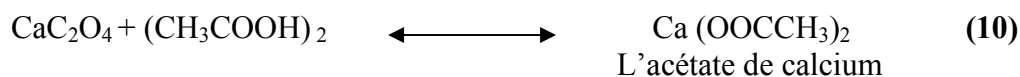
Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

dissolution suivie d'une augmentation de la densité des agrégats et des cristaux fragmentés. L'effet du vinaigre à différentes concentrations a montré une dissolution des agrégats de la whewellite jusqu'à 41,75% pour seulement une concentration volumique de 5% (v/v). La taille obtenue pour cette concentration est de 40,6µm ce qui est presque la moitié de la taille des agrégats à l'initiale. Tandis que pour la concentration volumique de 50% (v/v), la taille est de 14,3µm où la stabilisation se fait à 90min. L'effet majeur est celui de jus de citron, où on a enregistré des diminutions de taille supérieure à celles du vinaigre. À la concentration volumique de 50% (v/v) du jus de citron, la dissolution a donné des agrégats de taille 11,2µm. La stabilisation de cette taille a été obtenue à partir de 30min, avec une forme morphologique sous forme de point, à polarisation très intense. Cela laisse à supposer que le rapport ionique $Ca^{2+}/C_2O_4^{2-}$ ait été modifié par l'addition du citrate, d'où une diminution de la sursaturation.

Le jus de citron contient essentiellement 3 acides dont deux, l'acide malique et l'acide ascorbique sont de faibles teneurs face au troisième l'acide citrique (21, 22). Ce dernier est un acide organique tricarboxylique, en milieu alcalin, neutre ou faiblement acide, il est totalement ionisé sous forme d'ion citrate. Les trois acides carboxyliques vont avoir des interactions avec les ions Ca^{2+} en donnant du citrate de calcium (9), de l'ascorbate de calcium (8) et du malate de calcium (7). Par contre, le vinaigre contient de l'acide citrique, mais en faible quantité et de l'acide acétique qui rentre en réaction en donnant l'acétate de calcium (10). Les réactions favorables sont :



Par contre, le vinaigre contient un seul acide carboxylique qui rentre en réaction en donnant l'acétate de calcium.



Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

De nombreux travaux ont montré que le citrate réduit la cristallisation des sels calciques *in vitro* (23, 24). Il forme par complexation avec le calcium le citrate de calcium $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ qui est très soluble dans l'eau, ce qui fait diminuer la concentration des ions calcium (25). Hannequin et al (16), avec le modèle de cristallisation par turbidimétrie confirme la complexation des ions de calcium par le citrate. D'autres études dévoilent l'effet inhibiteur du citrate sur la croissance *in vitro* des cristaux d'oxalate de calcium, sur leur surface, leur taille et leur morphologie (5, 26, 27). Des travaux concernant la cristallisation *in vitro*, montrent que le citrate a eu un bon effet sur l'agrégation (28, 29). Notre étude présente un intérêt important dans la mesure où on a fait apparaître le rôle des deux substances sur la dissolution des agrégats de whewellite, une diminution de leur taille ainsi que leur dissolution complète, comme l'a montré le jus de citron à 50% (v/v) de sa concentration volumique.

On a mentionné sur la figure 37, les étapes de la dissolution des agrégats.

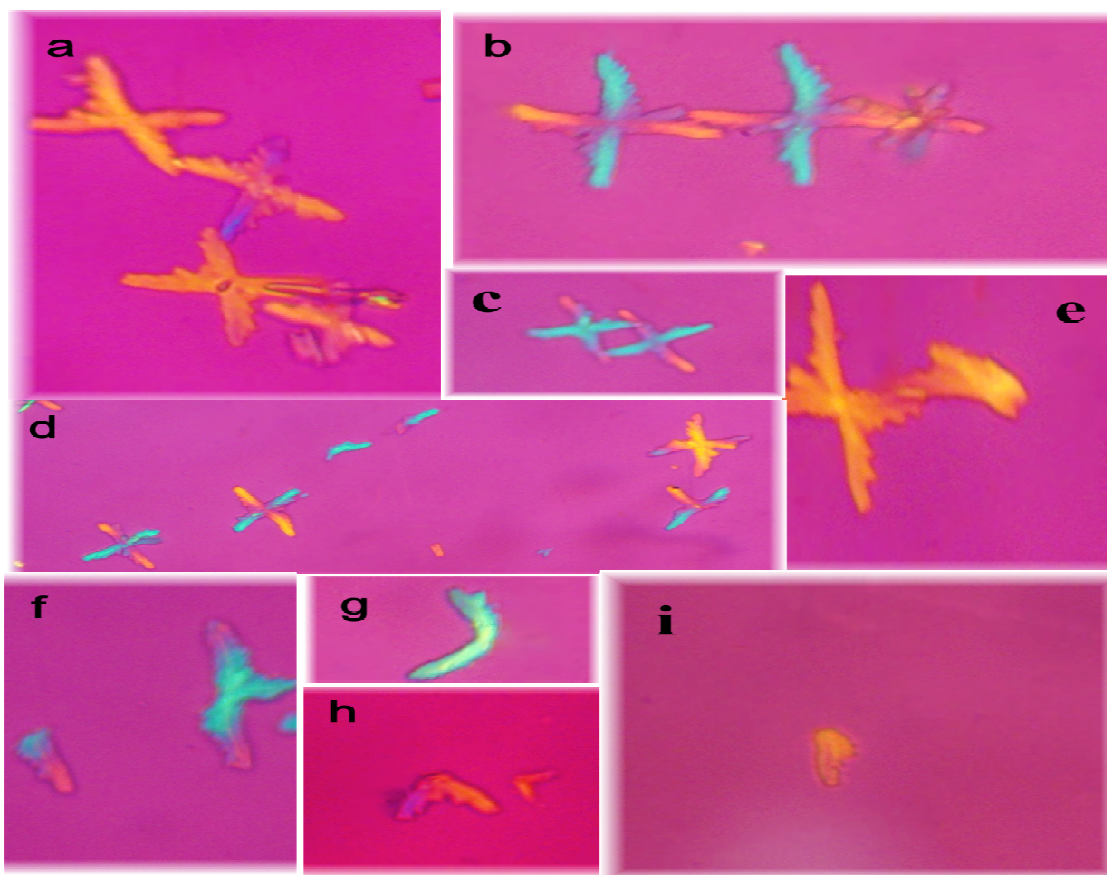


Figure 37 : Étapes de la dissolution des agrégats de whewellite de 5% (v/v), 10% (v/v), 25% (v/v) et 50% du citron et du vinaigre.

a, b, c : Dissolution et dissolution des agrégats.

d, e, f, g, h, i : Morphologie des cristaux fragmentés et disloqués

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

Selon des auteurs (30), le jus de citron peut être utilisé pour se prévenir des calculs rénaux, il devrait viser à rétablir la capacité de l'urine à inhiber la cristallisation oxalocalcique.

Quant à la plante, on peut conclure que son effet a été positif sur les agrégats où les taux de dissolution ont été importants. On remarque à la fin de l'expérience, un taux de dissolution qui est resté le même pour la concentration de 2g/100ml et la concentration 4g/100ml. Les tailles des agrégats obtenues ont été de 27,5µm à la fin de l'expérience. Leur stabilisation se constate à partir de 30min pour la concentration 4g/100ml et 60min pour la concentration 2g/100ml. L'activité de *Nigella sativa* a été surtout de dissoudre sans disperser les cristaux, mais on a observé au niveau de ces derniers des cassures et des fissures. L'activité de cette plante revient à sa composition, c'est une plante qui renferme beaucoup de substances actives à savoir la thymoquinone (31, 32), la nigellone (32), les Alkaloides (32) et les Saponines (32) qui peuvent être un sujet d'étude pour des travaux ultérieurs sur l'oxalate de calcium. Dans ce travail, on constate qu'il n'y a pas eu de conversion cristalline de l'oxalate de calcium monohydraté en oxalate dihydraté. Comme pour les chapitres précédents sur l'inhibition des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté, cette étude confirme que le pH n'a pas eu d'influence sur la dissolution des agrégats de whewellite par les substances naturelles, sachant que le pH des trois substances était différent.

Les bons résultats obtenus sur la dissolution des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté, nous ont incités à tester l'effet de la plante *Nigella sativa* sur les agrégats de whewellite et wheddellite.

Références bibliographiques

1. El-Reshaid K, Mughal H, Kapoor M. Epidemiological profile, mineral metabolic pattern and crystallographic analysis of urolithiasis in Kuwait Urolithiasis in Kuwait. *European journal of epidemiology*. 1997;13(2):229-34.
2. Meyer J. Physicochemistry of stone formation. *Urolithiasis: A medical and surgical reference*: WB Saunders, Philadelphia; 1990. p. 11.
3. Basavaraj DR, Biyani CS, Browning AJ, Cartledge JJ. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. *EAU-EBU update series*. 2007;5(3):126-36.
4. Kok DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OL. Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation. *Kidney international*. 1990;37(1):51-6.
5. Grases F, Costa-Bauza A. Study of factors affecting calcium oxalate crystalline aggregation. *British journal of urology*. 1990;66(3):240-4.
6. Ahlstrand C, Larsson L, Tiselius H-G. Variations in urine composition during the day in patients with calcium oxalate stone disease. *The Journal of urology*. 1984;131(1):77-81.
7. Azoury R, Robertson W, Garside J. Observations on in vitro and in vivo calcium oxalate crystalluria in primary calcium stone formers and normal subjects. *British journal of urology*. 1987;59(3):211-3.
8. Daudon M, Réveillaud R, editors. *Typage morphologique des calculs oxalocalciques et données étiopathogéniques*. *Annales d'urologie*; 1985: Elsevier.
9. Hallson P, Rose A. Chemical measurement of calcium oxalate crystalluria: results in various causes of calcium urolithiasis. *Urologia internationalis*. 1990;45(6):332-5.
10. Nguyen H, Daudon M, Réveillaud R, Jungers P. Etude de la cristallurie spontanée chez les lithiasiques oxalo-calciques. *Néphrologie*. 1987;8(2):65-9.
11. Robert M, Boullaran A, Colette C, Averous M, Monnier M. Urinary calcium oxalate saturation in 'stone formers' and normal subjects: an application of the EQUIL2 program. *British journal of urology*. 1994;73(4):358-61.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

12. Robertson W, Peacock M, Nordin B. Calcium oxalate crystalluria and urine saturation in recurrent renal stone-formers. *Clinical science*. 1971;40(5):365-74.
13. Tiselius H-G. Different estimates of the risk of calcium oxalate crystallization in urine. *European urology*. 1983;9:231-4.
14. Meiouet F, El Kabbaj S, Daudon M. Étude in vitro de l'activité litholytique de quatre plantes médicinales vis-à-vis des calculs urinaires de cystine. *Progrès en urologie*. 2011;21(1):40-7.
15. Baba Aissa F. *Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident"*, Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alger. 1999.
16. Hennequin C, Lalanne V, Daudon M, Lacour B, Druke T. A new approach to studying inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *Urological research*. 1993;21(2):101-8.
17. Jungers P, Daudon M, Conort P. *Lithiase rénale: diagnostic et traitement: Flammarion Médecine-Sciences*; 1999.
18. Thongboonkerd V, Semangoen T, Chutipongtanate S. Factors determining types and morphologies of calcium oxalate crystals: Molar concentrations, buffering, pH, stirring and temperature. *Clinica chimica acta*. 2006;367(1-2):120-31.
19. Hennequin M, Pajot J, Avignant D. Effects of different pH values of citric acid solutions on the calcium and phosphorus contents of human root dentin. *Journal of Endodontics*. 1994;20(11):551-4.
20. Daudon M, Jungers P, Lacour B, editors. *Clinical value of crystalluria study. Annales de biologie clinique*; 2004.
21. Karadeniz F. Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2004;28(4):267-71.
22. Violeta N, Trandafir I, Ionica ME. HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2010;38(1):44-8.
23. Seltzer MA, Low RK, McDonald M, Shami GS, Stoller ML. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *The Journal of urology*. 1996;156(3):907-9.
24. Wabner CL, Pak CY. Effect of orange juice consumption on urinary stone risk factors. *The Journal of urology*. 1993;149(6):1405-8.

Chapitre III : Dissolution des agrégats d'oxalate de calcium par les substances naturelles

25. Roques H. Fondement theorique du traitement des eaux. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 1990:41-3.
26. Purich D, Antinozzi P, Brown C. Inhibitory action of citrate on calcium oxalate monohydrate crystal nucleation and growth. *Urolithiasis 2*: Springer; 1994. p. 155-8.
27. Oussama A, Touhami M, Mbarki M. In vitro and in vivo study of effect of lemon juice on urinary lithogenesis. *Archivos espanoles de urologia*. 2005;58(10).
28. Kok DJ, Papafoulos SE, Blomen LJ, Bijvoet OL. Modulation of calcium oxalate monohydrate crystallization kinetics in vitro. *Kidney international*. 1988;34(3):346-50.
29. Kok D, Papapoulos S, Bijvoet O. Excessive crystal agglomeration with low citrate excretion in recurrent stone-formers. *The Lancet*. 1986;327(8489):1056-8.
30. Kulaksızoğlu S, Sofikerim M, Çevik C. In vitro effect of lemon and orange juices on calcium oxalate crystallization. *International Urology and Nephrology*. 2008;40(3):589-94.
31. Anwar MA. *Nigella sativa*: A bibliometric study of the literature on Habbat al-Barakah. *Malaysian Journal of Library & Information Science*. 2005;10(1):1-18.
32. Randhawa MA, Al-Ghamdi MS. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pak J Med Res*. 2002;41(2):77-83.

Chapitre IV

Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella Sativa*

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella Sativa*

1. Introduction

La lithiase urinaire est probablement l'une des plus anciennes et des plus courantes maladies identifiées. Elle engendre un sérieux problème de santé et de finance pour les malades, elle peut être récidive (1) et peut altérer la fonction rénale (2, 3). Le calcul est son principal témoin. Une étude réalisée par Djelloul et al, 2006 (4) ont montré que la lithiase urinaire a tendance à évoluer à l'ouest d'Algérie, comme cela a été observé dans d'autres pays avec une prédominance des calculs de forme oxalocalcique qui représente plus de 70% des cas dans le monde (1, 2, 5-13). Des traitements sont utilisés pour lutter contre la formation de ces calculs tels que la cure de diurèse et les médicaments. Cependant, ces approches restent jusqu'à présent loin des résultats attendus et ne peuvent satisfaire totalement au traitement de cette maladie, car leurs effets restent limités. C'est dans ce contexte précis que des travaux ont été mis au point afin d'étudier l'effet des inhibiteurs chimiques (citrate, magnésium aluminium et pyrophosphate) sur la cristallisation oxalocalcique (2, 12, 14, 15). D'autres auteurs tels que Abdelmalek et al, 2001 (16) ont étudié la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence d'acide citrique, de magnésium et des ions ferreux. Un autre moyen d'aspect rudimentaire peut remplacer l'approche chimique. Il s'agit des plantes médicinales ; utilisés depuis la nuit des temps comme remède contre les différentes maladies. Pour ce qui est de l'inhibition de l'oxalate de calcium, la littérature, donne le *Tribulus terrestris*, le *Bergenia ligulata* (17), le *Berberis vulgaris-Q* (18), *Taraxacum officinale* (19), *Ammi visnaga and Punica granatum* (20) et la *Nigella sativa linnaeus* (21) comme des plantes efficaces en se basant sur une approche paramétrique mettant l'accent sur la mesure de la taille, du nombre des cristaux et de l'observation de leur nature en absence et en présence de l'extrait de plante, préparé par décoction et extraction. Khoei et al, 2009 (22) ont réalisé des tests cliniques d'un extrait éthanoïque sur des rats. L'extrait, présenté comme principe actif issu des graines de *Nigella sativa* Linnaeus provoqué la diminution significative des tailles et du nombre des cristaux d'oxalate de calcium dans différentes parties des tubules.

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

Les graines de *Nigella sativa* Linnaeus est de la famille Ranunculaceae, une plante comestible cultivée en Europe, en Afrique du Nord et en Asie (23).

L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets de dissolution in vitro de l'extrait de *Nigella sativa* Linnaeus sur les calculs d'oxalate de calcium, types whewellite et weddellite. Une étude cinétique a été réalisée afin de suivre la libération du calcium avec le temps. En parallèle, la variation de masse des calculs et le pH du milieu ont été suivis afin de paramétrer la dissolution dans des conditions physiologiques humaines.

2. Matériel et méthodes

2.1. Etude morphologique des calculs

Le tableau 36 présente des informations sur quatre séries de calculs rénaux provenant de quatre patients différents.

Tableau 36 : Information sur les calculs utilisés

Calculs	Nombres	Dimensions (cm)	Mode élimination	Localisation	Age patient (an)	Sexe
Série I	33	0,6*0,4*0,3	expulsion	Rein gauche	43	M
Série II	17	0,7*0,4*0,3	expulsion	Rein droit	46	F
Série III	14	1*0,9*0,7	chirurgie	Rein gauche	50	M
Série IV	16	0,8*0,5*0,3	chirurgie	Rein droit	39	F

Afin d'assurer, une bonne reproductibilité des expériences, les échantillons de calcul expulsés par le même patient, choisis avec une composition similaire et un aspect identique, ceci pour avoir une bonne reproductibilité dans les expériences.

Dans un premier temps, les calculs ont été nettoyés, séchés à l'air et à température ambiante pendant 24 h, puis soumis à une analyse morpho-constitutionnelle selon le protocole décrit antérieurement (6, 24). Ensuite, une identification complémentaire a été réalisée par spectrophotométrie infrarouge de modèle Hyper IR Shimadzu par la technique du pastillage en bromure de potassium (24). Les résultats sont exprimés en constituant majoritaire du calcul et en constituant majoritaire du noyau pour apprécier les variations épidémiologiques (25, 26).

Le poids des calculs variait de 4,55 à 18,43 mg pour les calculs de type IIa et de 22,57 à 73,07 mg pour ceux de type Ia.

2.2. Libération de calcium

Après l'identification des calculs, trois calculs (27, 28) de chaque série ont été introduits séparément dans 80 ml d'extrait aqueux de NS et trois autres calculs dans le même volume d'eau distillée (solution témoin). L'extrait de plante a été préparé par infusion de deux grammes *Nigella sativa* en poudre pendant 30 minutes dans 100 ml (27) d'eau distillée bouillie. L'exposition des calculs aux extraits aqueux n'a pas entraîné de modification perceptible, c'est pourquoi ils ont été laissés au contact des solutions pendant douze semaines.

Tous les échantillons ont été mis sous agitation constante de 800 rpm (12) et à température ambiante. Le nombre d'essais permet d'estimer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (cv). Pendant trois mois, la libération du Ca^{+2} a été mesurée chaque semaine grâce à une électrode spécifique de calcium de modèle Orion modèle 97-20 et le pH des solutions prélevé à l'aide d'un microprocesseur pH-mètre (27, 28).

Périodiquement, tous les sept jours, les calculs ont été brièvement mis hors de l'expérience, le temps d'évaluer la perte de masse. A la fin des expériences, les calculs ont été séchés à l'air libre et analysés ensuite par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et par morphologie. L'activité de l'extrait a été évaluée en calculant le taux de dissolution des calculs après séjour dans le milieu expérimental, en comparant le poids final des calculs par rapport à leur poids initial avant l'incubation avec l'extrait. Le pourcentage de dissolution a été calculé par la formule suivante (27) :

$$D(\%) = \frac{P_{\text{initial}} - P_{\text{final}}}{P_{\text{initial}}} \times 100 \quad (7)$$

Où : D % est le taux de dissolution du calcul et P_{initial} , P_{final} sont les poids du calcul avant et après l'incubation dans l'extrait de plante et l'eau distillée.

2.3. Etude cinétique

La détermination de l'ordre cinétique de libération du calcium a été basée sur l'équation différentielle suivante (29):

$$\frac{dC}{dt} = k C^n \quad (8)$$

Où : C est la concentration du calcium libéré, k la constante de vitesse de la réaction, et n l'ordre de la réaction.

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

Après intégration de l'équation (8) par rapport au temps et pour une cinétique d'ordre zéro, l'équation obtenue est la suivante :

$$C = k t + C_0 \quad (9)$$

Tandis que son intégration pour une cinétique de pseudo premier ordre, l'équation devient sous sa forme exponentielle (30):

$$C = C_0 e^{-k_{app} t} \quad (10)$$

Où C_0 est la concentration initiale de calcium libérée et C est la concentration du calcium après un temps t , k : constante de vitesse de l'ordre zéro et k_{app} : constante de vitesse de premier pseudo ordre.

3. Résultats

3.1. Dissolution des calculs

La figure 38 présente l'étude morphologique des quatre séries de calculs oxalocalciques.

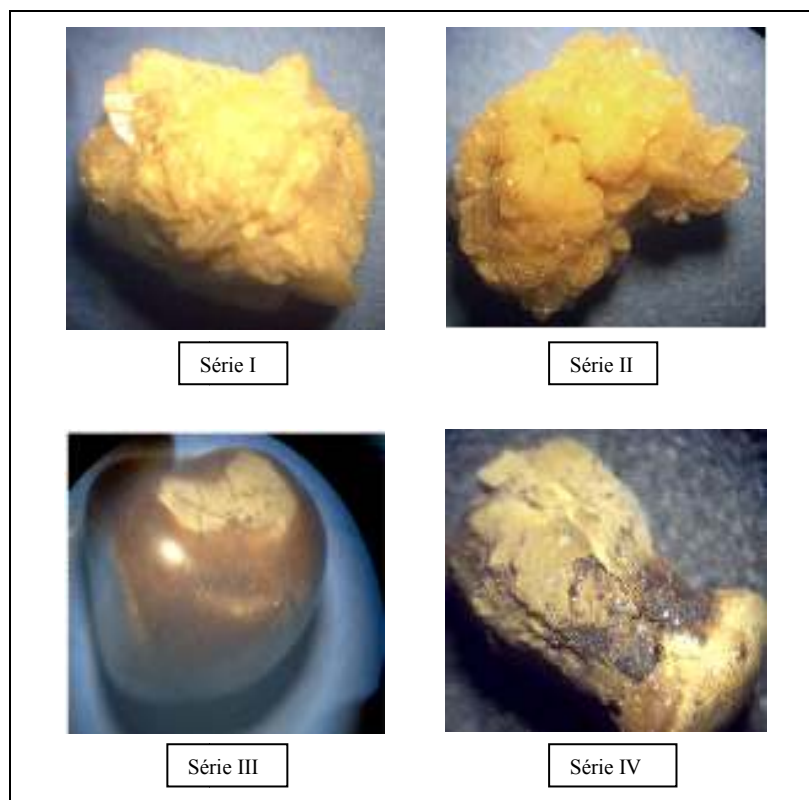


Figure 38 : Série I : IIa associée à Ia et IVa (en trace); série II : IIa associée à Ia et IVa; série III : Ia associée à IVa, whitlockite et nitrates et série IV : Ia associée à IVa et protéines.

3.1.1. Série I

Les calculs de cette série sont de forme ovale, une surface homogène de couleur brun jaune. L'oxalate de calcium dihydraté est le composant majoritaire associé à l'oxalate de calcium monohydraté avec la carbapatite en trace. Les résultats sont confirmés par spectrophotométrie infra rouge (figure 39) où les bandes principales de la weddellite sont 1630, 1325,08, 780, 606,49 et 517,44 cm^{-1} .

3.1.2. Série II

Cette série est constituée de calculs de surface faite de grosses lames cristallines enchevêtrées bruns jaunes clairs, aux angles plus ou moins émoussés. Ces calculs sont composés d'oxalate de calcium dihydraté en majorité, d'oxalate de calcium monohydraté et de carbapatite. La spectrophotométrie infrarouge (figure 39) a révélé que les calculs sont composés des bandes principales 1643,81, 1324,60, 780,75, 603,77 et 519,18 cm^{-1} , ce qui est en faveur d'une majorité en weddellite.

3.1.3. Série III

Ces calculs sont à surface lisse bosselée brun foncé. L'étude morphologique montre une prédominance de l'oxalate de calcium monohydraté associé à la carbapatite, les protéines et les nitrates en petite quantité, ce qui a été confirmé par l'étude spectrophotométrie infra rouge (figure 39). Les pics principaux sont 780,69, 1093,05, 1613,3 cm^{-1} , 3061,62, 3255,14, 3337,44 et 3488,59 cm^{-1} .

3.1.4. Série IV

Les calculs de la série IV ont une surface lisse ou mamelonnée ou bourgeonnante, couleur brune plus ou moins foncé. La composition faite par l'étude morphologique montre que le composé majoritaire est l'oxalate de calcium monohydraté avec la carbapatite et les protéines. Les bandes principales du spectre IRTF (figure 39) sont : 3487,84, 3337,26, 1619,7, 1315,59, 780,68 et 667,79 cm^{-1} .

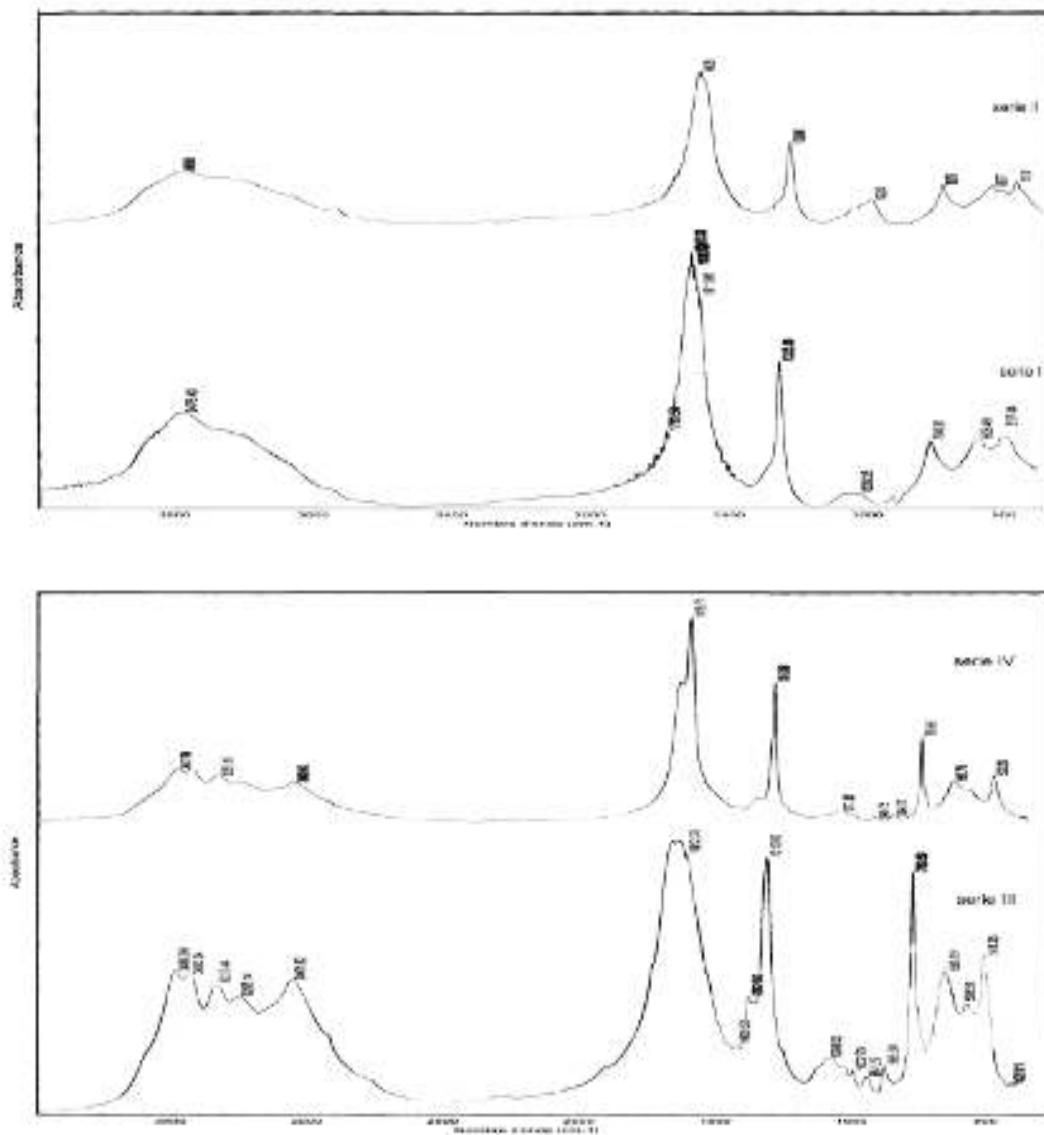


Figure 139: Spectre IRTF (série I) wheddellite associée à whewellite et la carbapatite (en trace), (série II) wheddellite associée à whewellite et carbapatite, (série III) whewellite associée à carbapatite, whitlokite et nitrates et (série IV) whewellite associé à carbapatite et protéines.

3.2. Libération du calcium

Les mesures de la quantité de calcium libérée par les calculs rénaux ont été réalisées en se référant à la courbe d'étalonnage ($pCa = -$ potentiel Ox/Red) illustrée par la figure 40.

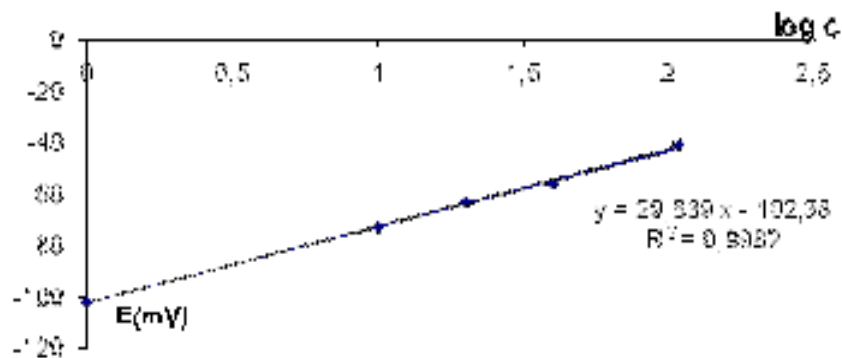


Figure 40 : Courbe d'étalonnage : $pCa = F(E)$

L'influence de l'extrait de *Nigella sativa* a été étudiée en mesurant le taux de calcium libéré durant trois mois, le coefficient de variation a été calculé pour chaque série et sa valeur inférieure à 10% confirme les résultats.

La figure 41 montre la cinétique de libération de l'ion calcium par les différents calculs durant 84 jours en présence de l'extrait aqueux de *Nigella sativa* et l'eau distillée.

3.2.1. Série I

Les résultats obtenus après 12 semaines de suivi, ont montré une variation explicite de la concentration en calcium dans l'extrait de *Nigella*. La libération est continue en fonction du temps et atteint 1337,14ppm en fin d'expérience avec un pH de 6,36 alors qu'en début, il a été de 6,73 (figure 42). Un saut maximum de Ca^{2+} a été enregistré entre la 3^{ème} et 4^{ème} semaine, soit une valeur de 424,35ppm. Concernant l'eau distillée, la libération du Ca^{2+} reste faible en fin d'expérience soit 200,78 ppm. La quantité de calcium libérée chaque semaine reste presque constante au cours du temps. Durant les expériences, le pH ne varie (figure 42). L'effet de l'extrait de *Nigella sativa* sur la dissolution du calcul de la série I, a enregistré une diminution de la masse au cours des douze semaines soit une dissolution de 0,99%, tandis que l'eau distillée a provoqué une dissolution de 6,37%.

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

3.2.2. Série II

La libération du Ca^{2+} par les calculs de la série II, a été en augmentation durant les douze semaines l'extrait aqueux de *Nigella sativa*. Elle a atteint une concentration considérable de 1518,14 ppm, alors qu'au septième jour elle a été seulement de 12,58ppm. Le plus grand saut 531,76 ppm a été observée entre la 4^{ème} et 5^{ème} semaine. Le pH des solutions varie entre 6,73 à t = 0 jour et 6,33 en fin d'expérience (figure 42). Par contre dans l'eau distillée, la quantité maximale libérée de Ca^{2+} après douze semaines de traitement a été de 450,13 ppm avec un pH de 6,35 tandis qu'au début il a été de 6,8 (figure 42). La masse du calcul de cette série subit une dissolution de 0,65% dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa*, alors qu'avec l'eau distillée le pourcentage a été de 3,74%.

3.2.3. Série III

La libération de Ca^{2+} par le calcul de la série III dans l'extrait de *Nigella sativa* a été en augmentation continue durant les 12 semaines. Une valeur de 1111,08 ppm a été enregistrée en fin d'expérience. On note une diminution minime du pH qui a été de 6,73 au début des expériences et 6,42 à la fin de la douzième semaine (figure 42). On remarque que la quantité maximale de Ca^{2+} a été enregistrée à la 5^{ème} semaine du traitement soit 327,94 ppm. En revanche, une libération moindre de Ca^{2+} par le calcul atteignant une valeur de 304,99 ppm à la douzième semaine a été observée dans l'eau distillée. Quant au pH, on enregistre une valeur de 6,8 à zéro jour pour être en fin d'expérience à 6,62 (figure 42). On remarque une diminution de 0,22%.de la masse du calcul de cette série soit dans *Nigella sativa*, par contre aucune dissolution n'est observée dans l'eau distillée durant les douze semaines.

3.2.4. Série IV

La libération de Ca^{2+} par les calculs de la série IV dans l'extrait de *Nigella sativa* augmente de façon continue durant les 12 semaines jusqu'à 1221,93 ppm, mais durant les deux premières semaines aucune libération n'a été observée. La quantité maximale de Ca^{2+} libérée est observée entre la 4^{ème} et 5^{ème} semaine, soit 381,47 ppm. On observe une variation du pH de 6,73 à 6,36 (figure 42). La libération de Ca^{2+} dans l'eau distillée est nulle pendant les trois premières semaines et atteint ensuite 283,34 ppm en fin d'expérience. Un petit saut de 114,69 ppm a été enregistré entre la 11^{ème} et 12^{ème} semaine. Quant au pH, il a varié de 6,8 à 6,44 (figure

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

42). La dissolution du calcul de la série IV dans l'extrait aqueux a été de 0,41% tandis que dans l'eau distillée, elle a été de 3,24%.

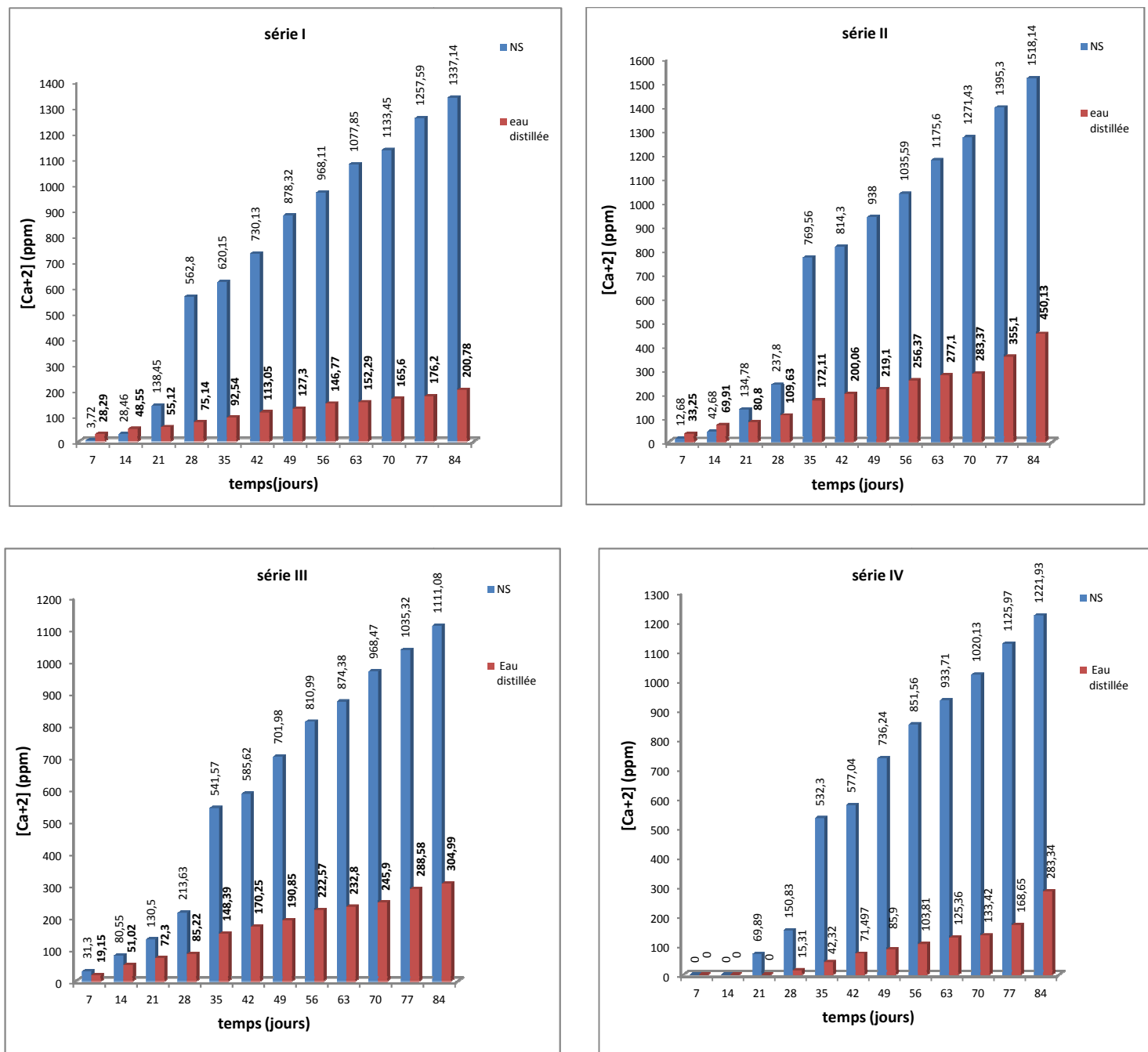


Figure 41 : Quantité de Ca^{+2} libéré par les calculs dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa* et l'eau distillée durant 84 jours

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

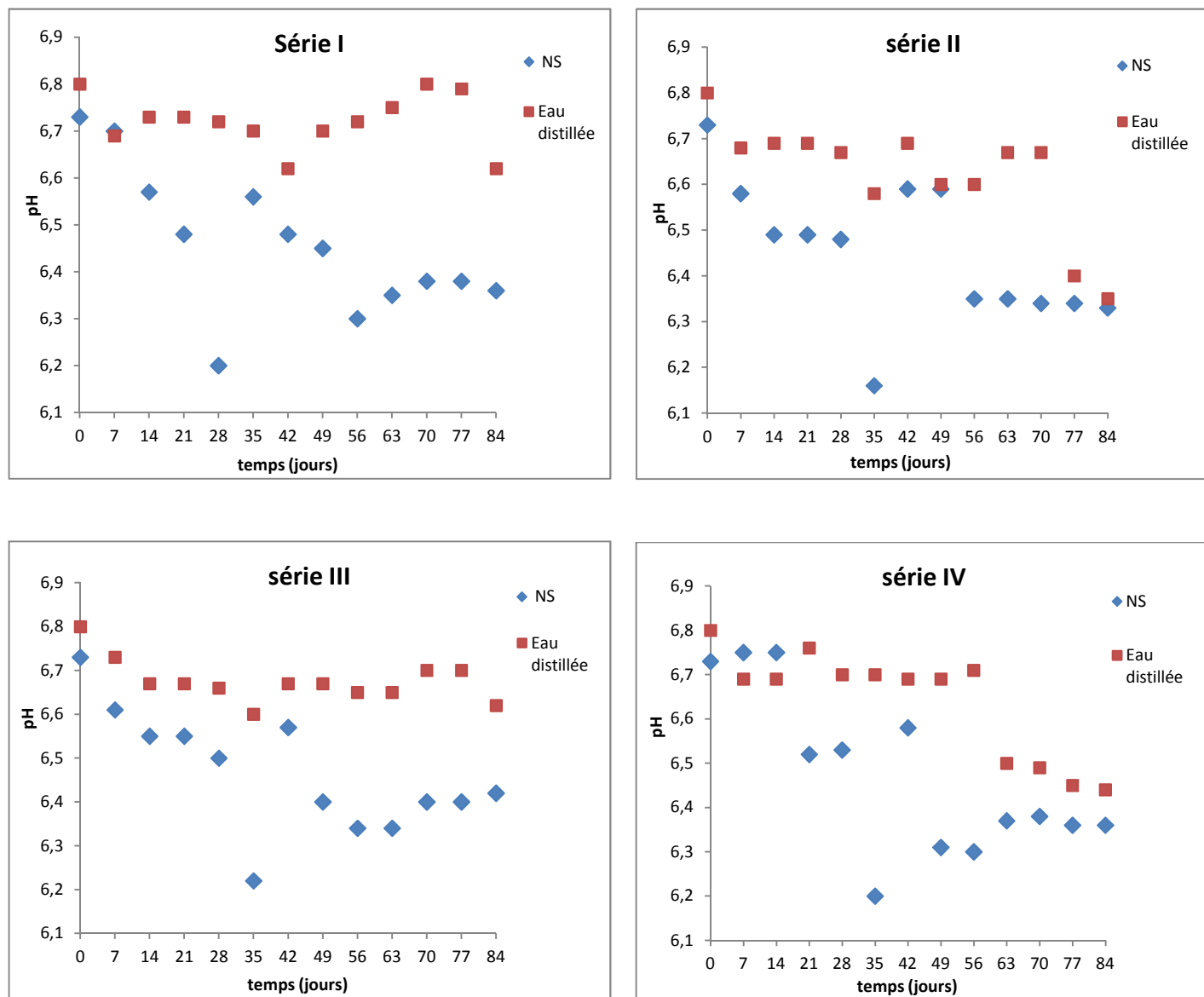


Figure 41 : Evolution de pH de l'extrait de plante et l'eau distillée en présence des calculs oxalo-calciques.

Le tableau 37, résume le taux de calcium libéré en fin d'expérience par les calculs rénaux immergés dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa* et l'eau distillée.

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

Tableau 37 : Taux de calcium libéré par les calculs immergés dans l'extrait de *Nigella sativa* et l'eau distillée.

	Taux de calcium libéré (ppm)	
	<i>Nigella sativa</i>	Eau distillée
Série I	1337,14	200,78
Série II	1518,14	450,13
Série III	1111,08	304,99
Série IV	1221,93	283,34

Sur le tableau 37, on constate que les calculs immergés dans l'eau distillée libèrent des quantités moins élevées de calcium par rapport aux mêmes calculs immergés dans l'extrait de *Nigella sativa*. Aussi, les calculs de weddellite (série I et II) libèrent plus de calcium que ceux de la whewellite (série III et IV) dans l'extrait de *Nigella*.

3.3. Etude cinétique

Les figures 43 et 44 montrent la cinétique de libération du calcium pour les différentes séries dans *Nigella sativa* et l'eau distillée séparément. Pour l'extrait de plante, le modèle de l'équation (8) donne des constantes de vitesse de 0,2377 et 0,1421 J⁻¹ pour les séries I et II, respectivement. A partir de la cinquième semaine apparaît une cinétique d'ordre zéro. La constante de la deuxième étape est de 14,509 mol.l⁻¹.J⁻¹ pour la série I et 15,791 mol.l⁻¹.J⁻¹ pour la série II. On note que durant la première période, le calcium de la série I se libère lentement par rapport au calcul de la série II. Alors qu'à la deuxième étape, la différence est minime.

L'eau distillée n'a pas eu le même effet sur la libération de calcium, l'évolution de la réaction suit une cinétique d'ordre zéro pendant toute la durée de l'expérience. Les constantes de vitesse dans ce cas sont de 2,2621 et 4,7828 mol.l⁻¹.J⁻¹ pour les séries I et II respectivement. Il est à noter que le calcium se libère plus facilement par les calculs de la série II que ceux de la série I à cause de la nature de chaque milieu, l'un est réactif en présence de l'extrait et l'autre est non réactif en présence de l'eau distillée.

L'étude du calcium libéré par les calculs d'oxalate de calcium monohydraté dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa*, a montré une évolution différente pour les deux séries jusqu'à la quatrième semaine. En effet, les calculs de la série III ont libéré le calcium suivant une cinétique de pseudo premier ordre avec une constante de vitesse apparente k_{app} de 0,0892 J⁻¹. Par contre, les calculs de la série IV, ont libéré le calcium selon une cinétique d'ordre zéro avec une constante de vitesse de 10,774 mg.l⁻¹.J⁻¹. A partir de la cinquième semaine est survenue une

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

deuxième étape d'ordre zéro avec une constante de vitesse de $12,071 \text{ mg.l}^{-1}.\text{J}^{-1}$ pour la série III et $14,466 \text{ mg.l}^{-1}.\text{J}^{-1}$ pour la série IV.

Dans l'eau distillée, la cinétique obtenue a été d'ordre zéro jusqu'à la fin des expériences avec une constante de $3,7326 \text{ mg.l}^{-1}.\text{J}^{-1}$ pour la série III et $2,9222 \text{ mg.l}^{-1}.\text{J}^{-1}$ pour la série IV. On note une légère différence entre les constantes de vitesses des calculs des deux séries dans les deux solutions.

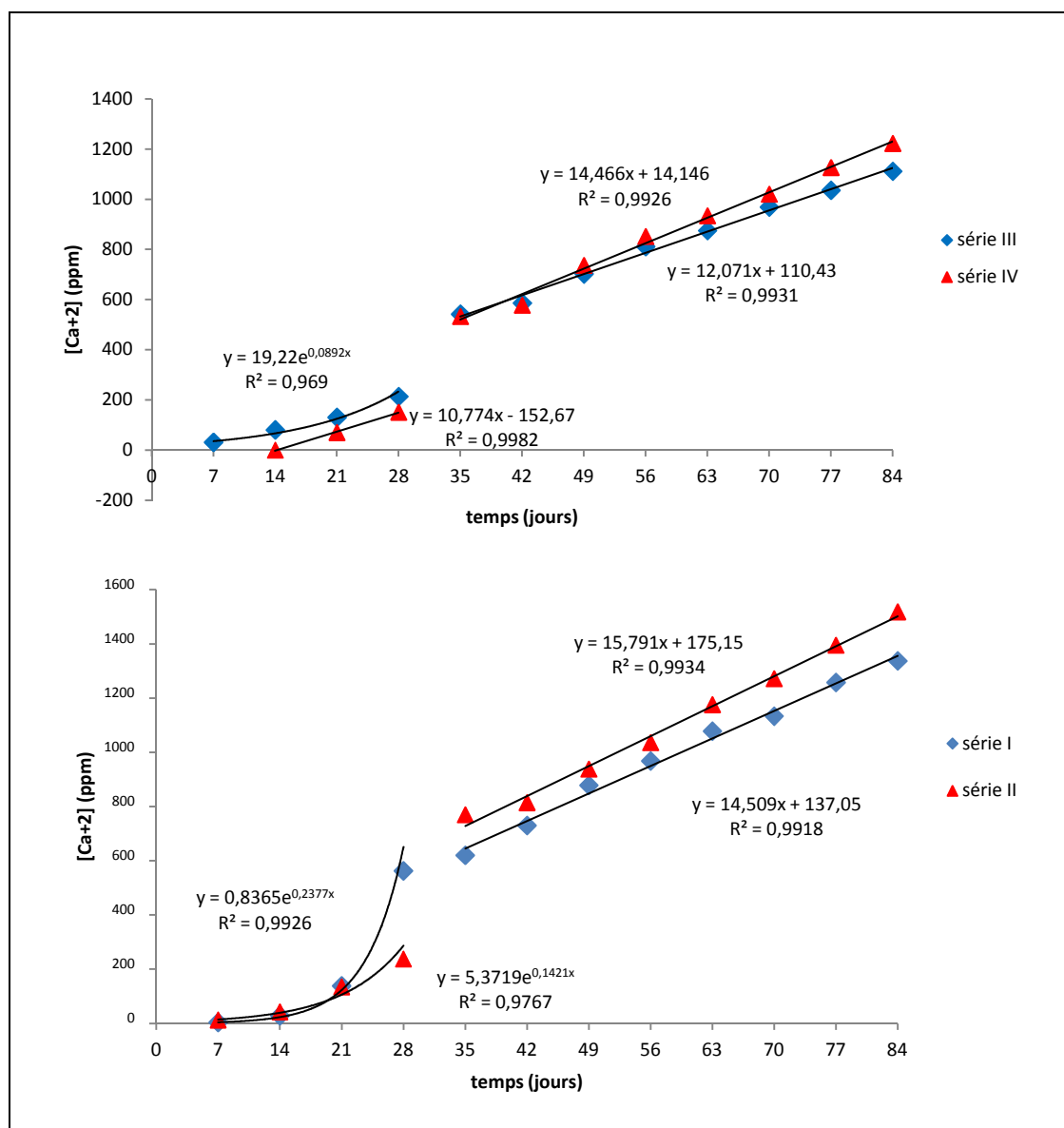


Figure 43 : Evolution cinétique des séries I, II, III et IV dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa*

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

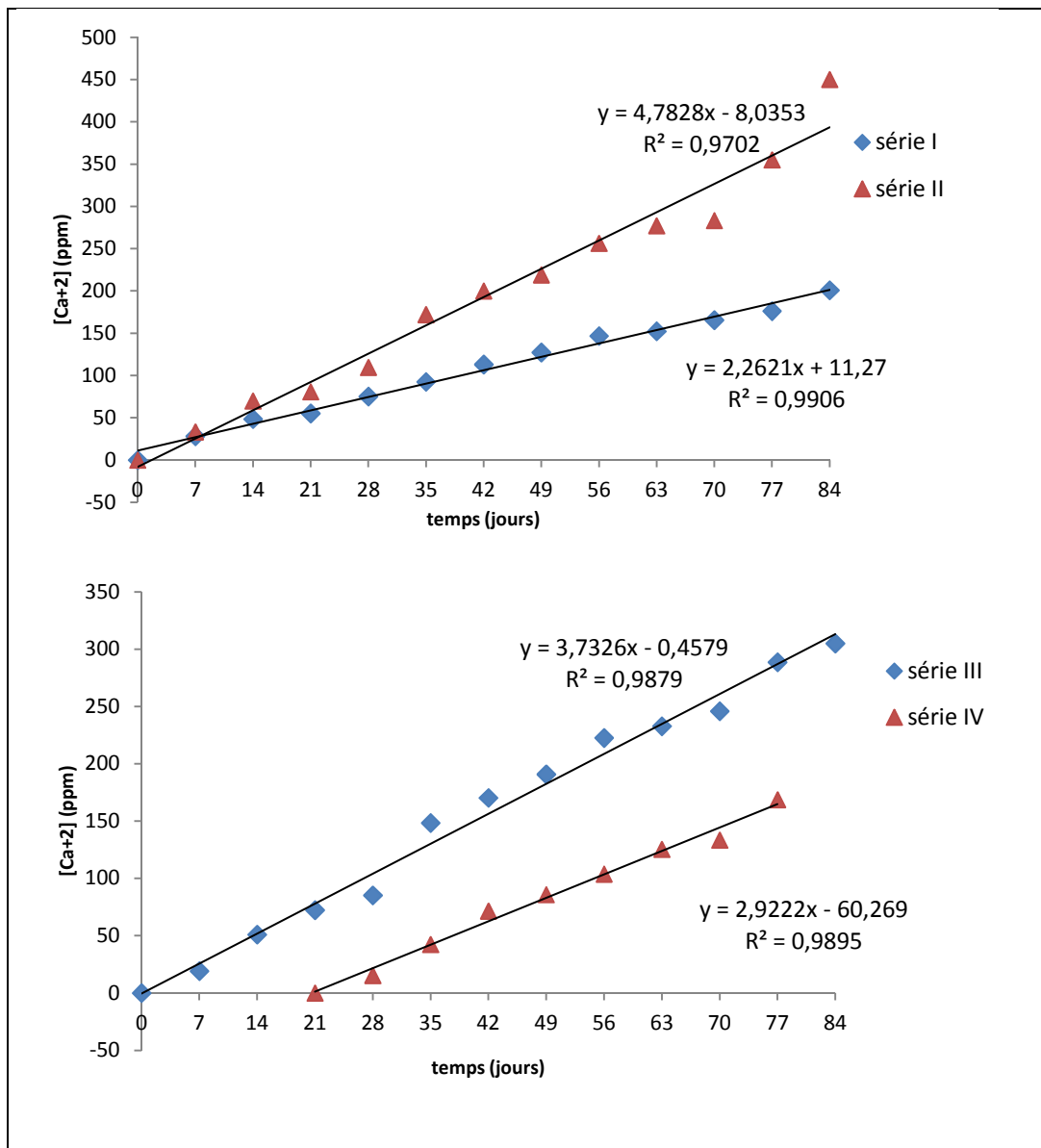


Figure 44 : Evolution cinétique des séries I, II, III et IV dans l'eau distillée

Le tableau 38 regroupe tous les résultats de l'étude cinétique de libération du calcium par les calculs.

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

Tableau 38 : Loi cinétique et constante des vitesses

Loi cinétique et constante de vitesse			
	solution	Première période	Deuxième période
Série I	<i>Nigella sativa</i>	Ordre un $7 < t \text{ (jours)} < 28$ Constante : 0,2377 (J^{-1})	Ordre zéro $35 < t \text{ (jours)} < 84$ Constante : 14,509 (ppm. J^{-1})
	Eau distillée	Ordre zéro $0 < t \text{ (jours)} < 84$ Constante : 2,2621 (ppm. J^{-1})	
Série II	<i>Nigella sativa</i>	Ordre un $7 < t \text{ (jours)} < 28$ Constante : 0,1421 (J^{-1})	Ordre zéro $35 < t \text{ (jours)} < 84$ Constante : 15,791 (ppm. J^{-1})
	Eau distillée	Ordre zéro $0 < t \text{ (jours)} < 84$ Constante : 4,7828 (ppm. J^{-1})	
Série III	<i>Nigella sativa</i>	Ordre un $7 < t \text{ (jours)} < 28$ Constante : 0,0892 (J^{-1})	Ordre zéro $35 < t \text{ (jours)} < 84$ Constante : 12,071 (ppm. J^{-1})
	Eau distillée	Ordre zéro $0 < t \text{ (jours)} < 84$ Constante : 3,7326 (ppm. J^{-1})	
Série IV	<i>Nigella sativa</i>	Ordre zéro $14 < t \text{ (jours)} < 28$ Constante : 10,774 (ppm. J^{-1})	Ordre zéro $35 < t \text{ (jours)} < 84$ Constante : 14,466 (ppm. J^{-1})
	Eau distillée	Ordre zéro $21 < t \text{ (jours)} < 84$ Constante : 2,9222 (ppm. J^{-1})	

4. Discussion

Dans cette étude, les résultats obtenus n'ont pas permis de voir une différence significative entre l'extrait et la solution témoin pour ce qui est de la perte de masse des calculs d'oxalate de calcium sur la période expérimentale choisie, ce qui demande sans doute plus de temps. En ce qui concerne le pH du milieu, en comparant la courbe de pH obtenue avec la solution témoin à celle obtenue avec l'extrait de *Nigella sativa*, on constate que les courbes sont très voisines, suggérant que les effets de l'extrait de la plante sur la perte de poids des calculs ne

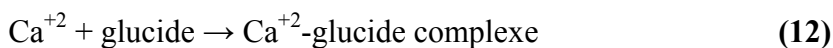
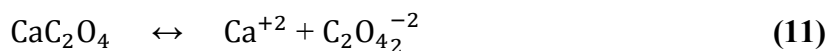
Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

sont pas liés au pH, mais à la composition chimique de l'extrait de la plante, ainsi qu'au processus de la dilution. Il est important de signaler que c'est une espèce qui ne dépend pas du pH (31).

On constate que dans tous les cas les calculs immergés dans l'eau distillée libèrent des quantités moins élevées de calcium par rapport aux calculs immergés dans l'extrait de *Nigella sativa*. Les calculs dans l'eau distillée libèrent le calcium avec pratiquement la même constante de vitesse, par contre, dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa* pour l'ordre un les calculs de weddellite libèrent plus facilement le calcium que ceux de whewellite de la série III. La formation des calculs oxalocalcique dépend de plusieurs facteurs tels que la sursaturation (32-34). Elle est générée par un excès de solutés cristallisables que sont l'oxalate et le calcium (2, 17) et se trouve ainsi en deux phases cristallines majeures que sont : l'oxalate de calcium monohydraté et l'oxalate de calcium dihydraté (6-8).

Nos observations suggèrent que la dissolution des calculs d'oxalate de calcium par l'extrait de plante est un processus dont le mécanisme est probablement indépendant de l'état de surface du calcul, ce qui pourrait expliquer l'effet similaire pour les deux types de calculs. Par contre, la libération de calcium par les calculs est bien plus significative dans l'extrait que dans l'eau distillée. On note que dans tous les cas, les calculs dans l'eau distillée libèrent du calcium avec pratiquement la même constante de vitesse. Par contre, dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa*, ce qui est pour l'ordre un, les calculs de weddellite libèrent plus facilement le calcium que ceux de whewellite de la série III. La formation des calculs oxalocalcique dépend de plusieurs facteurs tel que la sursaturation (2, 32-36). Elle est générée par un excès de solutés cristallisables que sont l'oxalate et le calcium (2, 17).

La capacité de libération de calcium par les calculs d'oxalate de calcium dans l'extrait résulte d'une interaction entre le calcul et les molécules présentes dans cette plante et extraites au cours du processus d'infusion. Cela peut être décrit par la formation de complexe de Ca^{++} avec les protéines (18) et les glucides (37). Ces derniers sont des composants de la *Nigella sativa* (38). Les réactions (37) :



Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

Das et al (18) ont montré que les acides aminés tels que l'acide glutamique et l'acide aspartique sont capables de dissoudre les cristaux d'oxalate de calcium.

Dans tous les cas observés, il est fortement probable qu'il y ait eu une adsorption physique entre l'extrait aqueux de *Nigella sativa* et les calculs (39). Il est également important de noter qu'aucune conversion cristalline n'a été observée pendant le processus de libération.

Pour la cinétique, on remarque que la libération de calcium suit pour les séries I, II et III la même cinétique. Quel que soit le milieu étudié, la cinétique demeure identique et se distingue par la présence de deux étapes successives. La première est d'ordre pseudo un et la deuxième d'ordre zéro pondéré à des coefficients de corrélation supérieurs à 0,9 attestant de la fiabilité du modèle proposé (testé). Le changement d'ordre apparaît lors de la libération maximale de la quantité de calcium pour toutes les séries immergées dans la plante. En se basant sur des concepts de base de chimie physique, il est possible de dire que la vitesse de réaction de la deuxième étape est indépendante de la concentration du réactif en l'occurrence l'extrait de *Nigella Sativa*. Ceci est assimilable et fréquemment rencontré dans les réactions catalytiques et enzymatiques lorsqu'un goulot d'étranglement limite le nombre de molécules réagissant au même moment. Par contre la première étape, elle tient compte de la concentration du réactif, qui est en excès ; la raison pour laquelle on assiste à une dégénérescence de l'ordre. Augmenter la période de contact des calculs dans l'extrait, augmente sa dissolution puisque le taux de libération du calcium est devenu avec le temps plus élevé avec une cinétique constante.

Références bibliographiques

1. Hassani MA, Hennequin C, Lacour B, Daudon M. Citraturie et cristallurie de weddellite. *Progrès en Urologie*. 2005;15:650-5.
2. Driouch A, Djelloul A, Kaid-Omar Z, Semmoud A, Rais A, Addou A. Optimized experimental design for the inhibition of calcium oxalate using a turbidimetric model. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2008;3(4):425-31.
3. Jungers P, Joly D, Barbey F, Choukroun G, Daudon M. ESRD caused by nephrolithiasis: prevalence, mechanisms, and prevention. *American journal of kidney diseases*. 2004;44(5):799-805.
4. Djelloul Z, Djelloul A, Bedjaoui A, Kaid-Omar Z, Attar A, Daudon M, et al. Lithiase urinaire dans l'Ouest algérien: Etude de la composition de 1354 calculs urinaires en relation avec leur localisation anatomique, l'âge et le sexe des patients. *Progrès en urologie*. 2006;16(3):328.
5. Kaid-Omar Z, Belouatek A, Driouch A, Taleb-Bendiab H, Lacour B, Addou A, et al. Effets de la cure de diurèse sur l'expulsabilité spontanée des calculs urinaires, le pH urinaire et la cristallurie des patients lithiasiques. *Progrès en Urologie*. 2001;11:450-7.
6. Daudon M, Bader C, Jungers P. Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microscopy*. 1993;7(3):1081-106.
7. Lewandowski S, Rodgers AL. Idiopathic calcium oxalate urolithiasis: risk factors and conservative treatment. *Clinica Chimica Acta*. 2004;345(1-2):17-34.
8. Grases F, Costa-Bauzá A, Prieto RM, Servera A. Internalization of Calcium Oxalate Calculi Developed in Narrow Cavities. *Urology case reports*. 2014;2(2):51-3.
9. Mittal A, Tandon S, Singla S, Tandon C. In vitro inhibition of calcium oxalate crystallization and crystal adherence to renal tubular epithelial cells by *Terminalia arjuna*. *Urolithiasis*. 2016;44(2):117-25.
10. Daudon M, Hennequin C, Lacour B, Le Moel G, Donsimoni R, Fellahi S, et al. Sex-and age-related composition of 10 617 calculi analyzed by infrared spectroscopy. *Urological research*. 1995;23(5):319-26.
11. Frąckowiak A, Skibiński P, Gawel W, Zaczyńska E, Czarny A, Gancarz R. Synthesis of glycoside derivatives of hydroxyanthraquinone with ability to dissolve and inhibit formation of

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

crystals of calcium oxalate. Potential compounds in kidney stone therapy. *European journal of medicinal chemistry*. 2010;45(3):1001-7.

12. Sharma D, Dey YN, Sikarwar I, Sijoria R, Wanjari MM, Jadhav AD. In vitro study of aqueous leaf extract of *Chenopodium album* for inhibition of calcium oxalate and brushite crystallization. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2016;3(2):164-71.

13. Daudon M, Letavernier E, Frochot V, Haymann J-P, Bazin D, Jungers P. Respective influence of calcium and oxalate urine concentration on the formation of calcium oxalate monohydrate or dihydrate crystals. *Comptes Rendus Chimie*. 2016;19(11-12):1504-13.

14. Djelloul A, Driouch A, Taleb F, Kaid-Omar Z, Semmoud A, Addou A. Experimental design study on the combined effect of citrate–pyrophosphate and citrate–aluminum on calcium oxalate monohydrate crystallization. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2012;7(3):328-36.

15. Grases F, Rodriguez A, Costa-Bauza A. Efficacy of mixtures of magnesium, citrate and phytate as calcium oxalate crystallization inhibitors in urine. *The Journal of urology*. 2015;194(3):812-9.

16. Abdelmalek F, Harrache D, Addou A, Taleb S, Semmoud A. Étude par turbidimétrie de la cristallisation oxalocalcique en présence de quelques inhibiteurs. *Physical and Chemical News*. 2001;1:96-107.

17. Joshi V, Parekh B, Joshi M, Vaidya A. Herbal extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata* inhibit growth of calcium oxalate monohydrate crystals in vitro. *Journal of Crystal Growth*. 2005;275(1-2):e1403-e8.

18. Das I, Gupta S, Pandey V, Ansari SA. Inhibition and dissolution of calcium oxalate crystals by *Berberis Vulgaris-Q* and other metabolites. *Journal of crystal growth*. 2004;267(3-4):654-61.

19. Yousefi Ghale-Salimi M, Eidi M, Ghaemi N, Khavari-Nejad RA. Inhibitory effects of taraxasterol and aqueous extract of *Taraxacum officinale* on calcium oxalate crystallization: in vitro study. *Renal failure*. 2018;40(1):298-305.

20. Kachkoul R, Houssaini TS, Miyah Y, Mohim M, El Habbani R, Lahrichi A. The study of the inhibitory effect of calcium oxalate monohydrate's crystallization by two medicinal and aromatic plants: *Ammi visnaga* and *Punica granatum*. *Progrès en Urologie*. 2018; 28(3):156-165.

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

21. Abdel-Aal E, Yassin A, El-Shahat M. Effect of crystallization parameters and presence of aqueous extract of *Nigella Sativa* on growth inhibition of calcium oxalate monohydrate particles. *Particulate Science and Technology*. 2018;36(2):226-34.
22. Khoei A, Hadjzadeh Z, Parizady M. Ethanolic extract of *nigella sativa* L seeds on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. *Urology journal*. 2009;4(2):86-90.
23. Taşkin MK, Çaliskan ÖA, Anil H, Abou-Gazar H, Khan IA, Bedir E. Triterpene saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish Journal of Chemistry*. 2005;29(5):561-9.
24. Daudon M. Analyse des calculs par spectrophotometrie infrarouge: avantages et limites de la methode. *Ann Biol Clin*. 1978;36:469-75.
25. Harrache D, Mesri Z, Addou A, Semmoud A, Lacour B, Daudon M. Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans l'Ouest Algérien par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. *L'Eurobiologiste*. 1997;31(228):11-6.
26. Daudon M, Doré B. Cristallographie des calculs urinaires. Aspects néphrologiques et urologiques. *Encycl Méd Chir. Elsevier, Paris), Néphrologie-Urologie*; 1999.
27. Meiouet F, El Kabbaj S, Daudon M. Étude in vitro de l'activité litholytique de quatre plantes médicinales vis-à-vis des calculs urinaires de cystine. *Progrès en urologie*. 2011;21(1):40-7.
28. Hannache B, Bazin D, Boutefnouchet A, Daudon M. Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro: étude à l'échelle mésoscopique. *Progrès en urologie*. 2012;22(10):577-82.
29. Muñoz JA, López-Mesas M, Valiente M. Inhibitors of oxalocalcic lithiasis: effects of their interactions on calcium oxalate crystallization. *Urology*. 2012;80(5):1163. e13-. e18.
30. Lozano R, Roman J, De Jesus F, Jerez A, Gaitan M, Ramos E. Kinetic studies by DSC on the thermal decomposition of calcium oxalate. *Thermochimica Acta*. 1989;143:93-100.
31. Daudon M, Jungers P, Lacour B, editors. Clinical value of crystalluria study. *Annales de biologie clinique*; 2004.
32. Deng S-P, Zheng H, Ouyang J-M. Crystallization rules of calcium oxalate crystals in lithogenic urine and in healthy urine in vitro. *Materials Science and Engineering: C*. 2006;26(4):683-7.

Chapitre IV : Etude cinétique et la dissolution des calculs oxalo-calciques en présence de l'extrait de *Nigella sativa*

33. Kacem B, Kaid-Omar Z, Daudon M, Semmoud A, Lacour B, Bougeard D, et al. Comparison of crystalluria in patients drinking either free or controlled water intake. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*. 2004;2:93-8.
34. Hennequin C, Lalanne V, Daudon M, Lacour B, Druke T. A new approach to studying inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *Urological research*. 1993;21(2):101-8.
35. Gardner G. Effect of pyrophosphate and phosphonate anions on the crystal growth kinetics of calcium oxalate hydrates. *The Journal of Physical Chemistry*. 1978;82(8):864-70.
36. Liang M, Bai Y, Huang L, Zheng W, Liu J. Inhibition of the crystal growth and aggregation of calcium oxalate by elemental selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;74(1):366-9.
37. Das I, Gupta S, Ansari SA, Pandey V, Rastogi R. In vitro inhibition and dissolution of calcium oxalate by edible plant *Trianthema monogyna* and pulse *Macrotyloma uniflorum* extracts. *Journal of crystal growth*. 2005;273(3-4):546-54.
38. Abu-Al-Basal MA. In vitro and in vivo anti-microbial effects of *Nigella sativa* Linn. seed extracts against clinical isolates from skin wound infections. *American Journal of Applied Sciences*. 2009;6(8):1440.
39. Ebrahimpour A, Perez L, Nancollas G. Induced crystal growth of calcium oxalate monohydrate at hydroxyapatite surfaces. The influence of human serum albumin, citrate, and magnesium. *Langmuir*. 1991;7(3):577-83.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail présenté dans notre thèse a pour objet de s'intéresser aux effets des substances naturelles sur la cristallisation oxalocalcique. Pour cela, on a orienté notre travail vers trois axes principaux qui sont :

Premièrement : une étude sur l'inhibition des cristaux whewellite par les jus de fruits riches en vitamine C et l'extrait d'infusion de *Nigella sativa*.

Deuxièmement : une dissolution des agrégats d'oxalate de calcium monohydraté par la *Nigella sativa*, le jus de citron et le vinaigre.

Troisièmement : une étude sur l'effet de *Nigella sativa* et la cinétique de libération de calcium par les calculs oxalocalcique.

Notre étude indique que *Nigella sativa*, peut être considérée comme un inhibiteur de la cristallisation oxalocalcique, elle a eu un bon effet sur les différentes phases de la cristallisation à savoir la nucléation, la croissance et l'agrégation. Le nombre et la taille des cristaux ont été diminués de manière significative par l'extrait. Ce dernier peut contenir des substances qui convertissent et inhibent le cristal d'oxalate de calcium monohydraté.

Bien que l'acide ascorbique soit essentiel dans le régime alimentaire humain pour la prévention des maladies, tous ses effets biologiques ne sont pas encore identifiés. La responsabilité lithogène de la vitamine C n'a jamais été clairement établie, car son mode d'action n'est pas encore connu. Les différences observées des teneurs en acide ascorbique des jus peuvent être dues à des différences de stade de maturité et de variétés régionales des fruits. Des facteurs tels que le climat, la température et les conditions climatiques peuvent affecter la concentration en acide ascorbique des fruits. Les agrumes sont riches en vitamine C, l'effet de la consommation de grandes quantités de leur jus est rarement discuté. Dans notre étude, les jus ont donnés de bons résultats sur la cristallisation oxalocalcique, ils ont réduit la sursaturation en oxalate de calcium et la taille des particules. Cette propriété est donc avantageuse, en empêchant la formation de calculs urinaires. En outre, les jus ont favorisé la formation de weddellite plutôt que la whewellites. Par contre, la vitamine C commerciale et l'acide ascorbique pur n'ont pas donné les résultats attendus. Les jus peuvent contenir des substances qui inhibent la croissance des particules d'oxalate de calcium monohydraté, c'est pourquoi d'autres investigations doivent

Conclusion générale

être entreprises pour étudier l'effet de la vitamine C sur la cristallisation oxalocalcique. Aussi des analyses peuvent être étendues sur les autres composants de fruits tels que l'acide citrique, l'acide tartrique...etc. Enfin, si les jus peuvent maintenir les particules d'oxalate de calcium dispersées en solution, ils seront susceptibles d'être éliminés plus facilement par les urines.

Notre modèle d'agrégation oxalocalcique de grande taille a donné des résultats très satisfaisants, on a pu étudier l'effet des substances telles que la *Nigella sativa* qui a fait objet de plusieurs recherches, le citron par son effet thérapeutique et le vinaigre. Ce modèle adopté est simple à manœuvrer, présente une bonne reproductibilité et offre la possibilité de suivre l'expérience en continuité. Les résultats montrent que le vinaigre, la *Nigella* et le jus de citron ont eu un pouvoir positif sur les agrégats, en diminuant leur taille et en ayant un effet sur la morphologie des cristaux. Ces résultats peuvent être très importants dans le traitement de la lithiase. Cette étude présente un intérêt important dans la mesure où l'on a fait apparaître le rôle de ces substances sur la dissolution des agrégats de whewellite, une diminution de leur taille ainsi que leur dissolution complète, comme l'a montré le jus de citron à 50% de sa concentration volumique.

L'effet de l'extrait de la plante *Nigella Sativa* sur les calculs d'oxalate de calcium a été étudié *in vitro*. L'évaluation des résultats par la perte de masse des calculs comparativement à la solution témoin, n'a pas permis de mettre en évidence un effet significatif de l'extrait sur la période expérimentale choisie. Cela peut être expliqué du fait d'une durée de contact insuffisante entre les calculs et l'extrait. En revanche, l'extrait de *Nigella Sativa* a eu un effet potentiel sur la libération du calcium, ce qui suggère une interaction entre le calcium et l'extrait, mais ne permet pas d'apporter une relation directe entre la dissolution des calculs et la teneur des solutions en calcium qui augmente. On note que dans tous les cas, les calculs dans l'eau distillée libèrent du calcium avec pratiquement la même constante de vitesse. Alors que dans l'extrait aqueux, la cinétique de libération de calcium demeure identique et se distingue par la présence de deux étapes successives, la première est d'ordre un et la deuxième d'ordre zéro.

Des essais complémentaires seront nécessaires pour objectiver un bénéfice scientifiquement démontré de l'extrait testé sur la solubilisation de tels calculs. Cette plante pourrait avoir un intérêt, qui reste à tester pour la prévention des récives. Cette tendance prouve que la connaissance de la dose de l'extrait de plante est indispensable à une libération adéquate de calcium.

Conclusion générale

L'importance du régime alimentaire sur la formation des calculs rénaux par la composition de nos aliments, nous incite à connaître les aliments qui par leur excès sont néfastes à notre santé et d'autres qui peuvent avoir des effets bénéfiques. La *Nigella* et le citron peuvent être un bon moyen de prévention de la récurrence, c'est pourquoi d'autres études sont nécessaires pour identifier leurs composants. Nos expériences prouvent bien que la cristallisation oxalocalcique est indépendante du pH. Les données obtenues suggèrent que la structure géométrique de la surface est susceptible d'être un facteur potentiel de compréhension de la cristallisation. D'autres investigations peuvent être entreprises pour découvrir les effets des différents composants contenus dans le citron et la *Nigella sativa* sur les cristaux, les agrégats et les calculs oxalocalciques. Il reste à vérifier *in vivo* nos conclusions, d'abord par une épidémiologie avec la population qui consomme le jus de citron et *Nigella sativa*, ensuite par un suivi des patients lithiasiques dont le taux d'oxalate est élevé (hyperoxalurie) et le calcium (hypercalciurie) afin de valider ces observations *in vitro*.